

**Abschätzung des Abbaupotentials mikrobieller Biozönosen  
und Identifizierung der am organischen Abbau  
beteiligten Bakteriengruppen  
mittels Isotopenmassenspektrometrie (IRMS)**

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte**

**Dissertation**

von  
Stefanie Tillmann  
aus Lübeck

1. Referent: Prof. Dr. Kenneth N. Timmis
2. Referent: Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer

eingereicht am 27.11.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am 27.02.2004

2004

---

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikation**

Abraham, W.-R., Hesse, C., Pelz, O., Hermann, S., Tesar, M., Moore, E.R.B. & Timmis, K.N. Sharing of nutritional resources in bacterial communities determined by isotopic ratio mass spectrometry of biomarkers. Focus on Biotechnology, Vol. 2, A. Durieux und J.-P. Simon (eds.), Kluwer Academic Publishers, Brüssel, Applied Microbiology: 143-154 (2001)

### **Tagungsbeiträge**

Hermann, S., Hesse, C. & Abraham, W.-R.: Carbon isotope fractionation in different biomolecules used in microbial ecology. a kinetic study to monitor substrate metabolism. (Poster) International conference on applications of stable isotope techniques to ecological studies, Braunschweig (2000)

Hermann, S., Hesse, C. & Abraham, W.-R.: Monitoring substrate metabolism by microorganisms: a kinetic study of isotopic discrimination of different biomolecules used in microbial ecology. (Vortrag) Biotechnology 2000, Berlin (2000)

Hermann, S., Hesse, C. & Abraham, W.-R.: Carbon isotope fractionation in different microbial biomolecules. (Poster) VAAM-Jahrestagung Oldenburg (2001)

Hermann, S., Hesse, C. & Abraham, W.-R.: Carbon isotope fractionation in different biomolecules used in microbial ecology – a kinetic study to monitor substrate metabolism (Poster) Internationales Symposium „Biotechnological remediation of water pollution by acid inorganic and aromatic chlorinated compounds“ Leipzig (2001)

Tillmann, S., Hesse, C. & Abraham, W.-R.: Carbon isotope fractionation in different microbial biomolecules. (Poster) Strategiefondprojekt HGF Leipzig (2001)

---

Tillmann, S., Surges, E. & Abraham, W.-R.: Monitoring a microbial community in a continuous culture using immunological measurements and stable isotopes. (Vortrag) VAAM-Jahrestagung Göttingen (2002)

Tillmann, S., Timmis, K. N. & Abraham, W.-R.: Carbon flux in biofilms grown on PCB-droplets. (Poster) ASM Conferences, Biofilms 2003, Victoria, British Columbia, Kanada (2003)

## INHALT

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Kultivierungsunabhängige Methoden zur Beschreibung komplexer mikrobieller Systeme .....	2
1.1.1	Aktivitätsanalysen in mikrobiellen Gemeinschaften.....	4
1.1.2	Grundlagen der Isotopenmassenspektrometrie .....	5
1.1.3	Separation von Biomarker-Molekülen vor der Isotopenanalyse.....	8
1.2	Von der bakteriellen Reinkultur über ein definiertes Konsortium zu komplexen Habitaten .....	9
1.2.1	Definiertes mikrobielles Konsortium in kontinuierlicher Kultur .....	10
1.2.2	Biofilme auf polychlorierten Biphenylen (PCB) .....	10
1.2.3	Belebtschlamm als komplexes biologisches System .....	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	Geräte .....	15
2.2	Analyse von Substraten und Metaboliten.....	16
2.2.1	Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC.....	16
2.2.2	Photometrische Analyse von Metaboliten.....	16
2.3	Bakterien .....	17
2.3.1	Chemostaten-Konsortium.....	17
2.3.2	Bakterien aus PCB-belastetem Boden.....	17
2.3.3	Belebtschlamm als mikrobielles System.....	19
2.4	Bakterienwachstum und Zellzahl .....	19
2.4.1	Bakterienwachstum in Batch-Kulturen .....	20
2.4.2	Bakterienwachstum im Chemostaten .....	20
2.4.3	Wachstum von Belebtschlamm im Chemostaten .....	23
2.4.4	Biofilmentwicklung auf PCB-beschichteten Trägern .....	24
2.5	Indirekte Immunfluoreszenz .....	25
2.6	Extraktion und Analyse-Methoden für Nukleinsäuren .....	27
2.6.1	Isolierung der Ribonukleinsäuren aus der Biomasse .....	27
2.6.1.1	RNA-Extraktion mit denaturierendem GTC-Extraktionspuffer .....	27
2.6.1.2	Säulen-Zentrifugations-Aufreinigung der RNA.....	28
2.6.1.3	Simultane RNA- und DNA-Extraktion .....	28
2.6.2	Kontrolle und Quantifizierung der Nukleinsäuren.....	29

---

2.6.2.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	29
2.6.2.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen .....	30
2.6.3	Sequenzierung der 23S-ribosomalen Ribonukleinsäure .....	31
2.6.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	31
2.6.3.2	Sequenzierung des PCR-Produktes .....	32
2.7	Hybridisierung der Ribonukleinsäuren .....	34
2.7.1	Dot-Blot-Hybridisierung .....	34
2.7.2	Hybridisierung mit paramagnetischen Partikeln .....	37
2.7.2.1	Hybridisierung mit paramagnetischen Partikeln mit kovalenter Bindung zum Oligonukleotid.....	37
2.7.2.2	Hybridisierung mit bioginylierten Oligonukleotiden.....	38
2.7.3	Bindung von rRNA am BIACORE® .....	39
2.8	Reinheitskontrollen der nach der Hybridisierung abgetrennten rRNA .....	40
2.8.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	40
2.8.2	Analyse am MALDI-Massenspektrometer .....	41
2.9	Molekularbiologische Fingerprint-Techniken.....	41
2.9.1	Genomische Fingerprintanalysen mittels repetitiver Polymerasekettenreaktion .	41
2.9.2	„Single-Stranded Conformation Polymorphism“ SSCP .....	42
2.10	Analyse von Fettsäuren und Aminosäuren.....	46
2.10.1	Lipidanalyse .....	46
2.10.1.1	Extraktion und Trennung der intakten Lipide .....	46
2.10.1.2	Hydrolyse der Lipide und Methylierung der Fettsäuren .....	47
2.10.1.3	Extraktion und Methylierung der gesamten Fettsäuren (MIDI).....	48
2.10.1.4	Analyse der Fettsäuren mittels Gaschromatographie.....	48
2.10.2	Analyse der Aminosäuren .....	49
2.10.2.1	Saure Hydrolyse der Bakterien und Derivatisierung der Aminosäuren.....	49
2.10.2.2	Gaschromatographie der Aminosäurederivate .....	50
2.11	Analytik der polychlorierten Biphenyle (PCB).....	50
2.12	Isotopenmassenspektrometrie (IRMS).....	51
2.12.1	Analyse der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Substrate, Biomasse und Nukleinsäuren mit dem Elementaranalysator-IRMS .....	52
2.12.2	Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Fettsäuremethylester am Gaschromatographen-IRMS.....	52
2.12.3	Ermittlung der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Fettsäuren mittels Massenbalance .....	53
2.12.4	Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Aminosäurederivate .....	53
2.12.5	Berechnung der Isotopenfraktionierung.....	55

<b>3</b>	<b>Experimente und Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
3.1	Entwicklung Stamm-spezifischer Oligonukleotid-Sonden und Optimierung der Hybridisierung.....	57
3.1.1	Vergleich der 23S-rDNA-Sequenzen und Sonden-Entwicklung .....	57
3.1.2	Hybridisierung und Separation von 23S-rRNA-Molekülen mit paramagnetischen Partikeln .....	59
3.1.3	Hybridisierung im Zellendurchflussverfahren am BIACORE® .....	61
3.2	Messungen am Elementaranalysator-Isotopenmassenspektrometer (EA-IRMS) ....	63
3.3	Separation <sup>13</sup> C-markierter rRNA.....	66
3.3.1	Spezifische Separation geringer Anteile <sup>13</sup> C-markierter RNA .....	67
3.3.2	Kontrollen zur Reinheit der 23S-rRNA nach der Separation.....	69
3.4	Einfluss von Isotopeneffekten in der Synthese von Biomolekülen.....	72
3.5	Isotopen-Markierung des bakteriellen Konsortiums in kontinuierlicher Kultur .....	76
3.5.1	Prozentuale Verteilung der vier Stämme im Chemostaten .....	78
3.5.2	Isotopenanreicherung der Biomasse und der Gesamt-RNA im Chemostaten-Konsortium nach Zugabe von [U- <sup>13</sup> C]-4-Cl-Catechol .....	82
3.5.3	Isotopenanreicherung in den Fettsäuren und Aminosäuren .....	84
3.5.4	Isotopenanreicherung in der 23S-rRNA der Hauptvertreter des Chemostaten-Konsortiums nach Zugabe von [U- <sup>13</sup> C]-4-Cl-Catechol .....	87
3.6	Mikrobielle Biofilme auf polychlorierten Biphenylen (PCB).....	89
3.6.1	Entwicklung und Struktur der auf PCB gewachsenen Biofilme .....	90
3.6.2	RNA-Extraktion aus PCB-Biofilmen .....	92
3.6.3	SSCP-Fingerabdruck-Analysen der Biofilm-Gemeinschaft .....	93
3.6.4	Veränderung des PCB-Gemisches durch mikrobielles Wachstum .....	96
3.7	Markierung des PCB-Biofilms mit [U- <sup>13</sup> C]-2,2'-Dichlorobiphenyl .....	98
3.8	Belebtschlamm als komplexes biologisches System .....	102
3.8.1	Wachstum und RNA-Gehalt von Belebtschlamm unter Laborbedingungen .....	102
3.8.2	Molekularbiologischer Fingerabdruck des Belebtschlammes vor und nach der Separation mit phylogenetischen Sonden .....	103
3.9	Isotopenmarkierung in Belebtschlamm.....	105
3.9.1	Analyse des Belebtschlammes nach Zugabe von [U- <sup>13</sup> C]-4-Cl-Catechol .....	105
3.9.2	Markierung der rRNA des Belebtschlammes mit verschiedenen [U- <sup>13</sup> C]-Substraten in Batch-Kulturen .....	111
3.9.3	Isotopenmarkierung in den Fettsäuren des Belebtschlammes .....	114

---

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>118</b>
4.1	Auswahl von Biomarker-Molekülen für die Isotopenanalyse.....	119
4.1.1	Entwicklung stammspezifischer Oligonukleotid-Sonden .....	120
4.1.2	Separation spezifischer rRNA-Moleküle .....	123
4.1.3	Analyse stabiler Isotope am Isotopenmassenspektrometer (IRMS) .....	125
4.1.4	Anforderungen an Biomarker-Moleküle für die Isotopenanalyse.....	128
4.2	Isotopenmarkierung des definierten bakteriellen Konsortiums im Chemostaten mit [U- <sup>13</sup> C]-4-Cl-Catechol.....	133
4.3	Identifizierung der 2,2'-Dichlorobiphenyl-abbauenden Bakterien in Biofilmen auf PCB .....	136
4.3.1	Strukturelle Entwicklung und mikrobielle Zusammensetzung der PCB-Biofilme .....	137
4.3.2	Isotopenmarkierung des PCB-Biofilms mit [U- <sup>13</sup> C]-2,2'-Dichlorobiphenyl.....	139
4.4	Identifizierung der am Abbau definierter Substrate beteiligten Bakterien in Belebtschlamm .....	143
4.4.1	Interpretation natürlicher Isotopenverteilungen in Belebtschlamm .....	145
4.4.2	4-Cl-Catechol-abbauende Bakterien in kontinuierlicher und in Batch-Kultur ..	146
4.4.3	Phenol-, Acetat- und Histidin-abbauende Bakterien in Belebtschlamm.....	148
4.5	Vergleich der Isotopenanalysen in unterschiedlichen Biomarker-Molekülen und Biozönosen .....	150
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>154</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>172</b>



## ABKÜRZUNGEN

A	Adenin oder (Desoxy-) Adenosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	Bovin serum albumin
C	Cytosin oder (Desoxy-) Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cy3	Indocarbocyan
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>dest.</i>	destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EA	Elementaranalysator
ECL	Äquivalente Kettenlängenwerte (equivalent chain length)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
<i>et al.</i>	und von anderen
FA	Fettsäuren
FAME	Fettsäuremethylester (fatty acid methyl ester)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin oder (Desoxy-) Guanosin
g	Gramm
<i>g</i>	Einheit der Erdbeschleunigung ( $9.807 \text{ m s}^{-2}$ )
GC	Gaschromatograph
GL	Glykolipide
GTC	Guanidinisothiocyanat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (high performance liquid chromatograph)
IRMS	Isotopenmassenspektrometer (isotope ratio mass spectrometer)
K	Kelvin

---

L	Liter
M	Adenin und Cytosin
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol L <sup>-1</sup>
MS	Massenspektrometer
NL	neutrale Lipide
PCB	polychlorierte Biphenyle
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PL	Phospholipide
PVT	Polyvinylpyrrolidon
R	Adenin und Guanin
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Guanin und Cytosin
SSC	Natriumchlorid mit Natriumcitrat (saline sodiumcitrat)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
T	Thymin oder Desoxythymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (unit)
[U- <sup>13</sup> C]	vollständig mit <sup>13</sup> C markiert (uniformly labelled)
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Adenin und Thymin
Y	Cytosin und Thymin
z.B.	zum Beispiel

# 1 EINLEITUNG

Mikroorganismen sind mit ihrer enormen metabolischen Diversität für einen Großteil der globalen Mineralisierungsleistung verantwortlich. Im Laufe der Evolution hat sich eine Vielzahl von Mikroorganismen entwickelt, die verschiedenste Naturstoffe als Nahrungsquelle nutzen und abbauen können. Trotzdem gibt es Stoffgruppen, wie chlorierte Aromaten, die von den meisten Organismen nicht angegriffen werden können und häufig wachstumshemmend oder sogar toxisch wirken. Chlorierte organische Verbindungen bilden eine Stoffgruppe, die für den Menschen von hoher technischer und wirtschaftlicher Bedeutung ist (Reineke, 2000). Manche Chloraromate werden, wie die Pestizide (Herbizide, Insektizide und Fungizide), mit dem Ziel produziert, sie in die Umwelt auszubringen, andere werden während ihrer Nutzung, wie die polychlorierten Biphenyle (PCBs), durch Leckagen frei, oder sie gelangen über Zwischen- oder Nebenprodukte der Industrie ins Abwasser, in Abfällen auf Deponien oder in die Abluft. So sind chlorierte organische Verbindungen nicht nur in hohen Konzentrationen an „Altlastenstandorten“ nachweisbar, sondern ubiquitär verbreitet (MacDonald *et al.*, 2000). Der mögliche Eintrag ins Grundwasser bzw. Trinkwasser birgt gesundheitliche Risiken, die kostenintensive Sanierungsmaßnahmen, ob biologisch oder chemisch-physikalisch, erforderlich machen. Zunächst sollte jedoch hier das biologische Selbstreinigungspotential vor Ort (*in situ*) analysiert werden.

Aus schadstoffbelasteten Habitaten konnten Mikroorganismen, sowohl Bakterien als auch Pilze, isoliert werden, die chlorierte organische Verbindungen angreifen oder sogar vollständig metabolisieren (Knackmuss *et al.*, 1984; Reineke, 1988; Fedi, 2001). Allerdings wurden nach neueren Schätzungen von Torsvik und Ovreas (2002) bis dato erst 0.1 % aller im Boden lebenden Mikroorganismen im Labor kultiviert und auch in anderen Habitaten ist ein Großteil der mikrobiellen Diversität nur mittels kultivierungsunabhängiger Methoden fassbar (Whitman *et al.*, 1998; Rondon *et al.*, 2000; Torsvik *et al.*, 2002; Curtis *et al.*, 2002). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass einige dieser Organismen oder Konsortien potentiell eine bessere Abbauleistung zeigen als die, die im Labor zur Verfügung stehen. In den letzten Jahren wurden daher neue kultivierungsunabhängige Methoden entwickelt, welche sowohl die Strukturen von mikrobiellen Gemeinschaften aufdecken als auch die Identifizierung der aktiven Organismen *in situ* ermöglichen (Amann *et al.*, 1995; Dahllöf, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der Isotopenmassenspektrometrie (IRMS) eine kultivierungsunabhängige Methode optimiert und in mikrobiellen Biozönosen angewendet. Mit dem stabilen Isotop  $^{13}\text{C}$  markierte Substrate, hauptsächlich chlorierte aromatische Verbindungen, wurden nach dem Einbau in den Biomarker-Molekülen der

Phospholipidfettsäuren (PL-FA) und den ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNA) nachgewiesen, um so die am Substratabbau beteiligten Bakteriengruppen zu identifizieren.

## 1.1 Kultivierungsunabhängige Methoden zur Beschreibung komplexer mikrobieller Systeme

**Mikroskopische Analysen** von natürlichen Populationen können eine Vielzahl an Informationen über Zellgrößen und -anzahl, ihre Heterogenität und die räumliche Verteilung z.B. in Biofilmen liefern (Costerton, 1995). Allerdings sind Mikroorganismen anhand ihrer Morphologie kaum identifizierbar, so dass andere Methoden entwickelt wurden, die mittels Detektion und Separation von bestimmten biochemischen Verbindungen und Molekülen mit genetischem Potential aus der gemischten Population Rückschlüsse auf die vorhandenen Mikroorganismen erlauben. Sobald spezifische Verbindungen auf spezielle mikrobielle Gruppen begrenzt sind, ermöglichen sie ihre Identifizierung in der Gemeinschaft und letztendlich eine Beschreibung der Population. Als Biomarker-Moleküle werden daher alle biologischen Verbindungen bezeichnet, die genutzt werden können, um Merkmale einer bestimmten mikrobiellen Gemeinschaft aufzuzeigen (Morgan und Winstanley, 1997). Darunter fallen biochemische Komponenten der Zelle, wie Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren (DNA und RNA), Fettsäuren oder sogar ganze Zellen, wie z.B. *Escherichia coli*, welche als Biomarker für fäkale Kontaminationen genutzt werden.

**Fettsäuren**, speziell die Phospholipid-Fettsäuren (PLFA), sind als Hauptbestandteil von Zellmembranen in allen Organismen vorhanden. Eine Ausnahme bilden hier nur die Archaea, welche stattdessen Etherlipide synthetisieren. Unter den Fettsäuren kommen einige nur in eukaryotischen Zellen vor, andere werden hauptsächlich von Bakterien gebildet, in denen die Synthese von charakteristischen Fettsäuren für einzelne Bakteriengruppen noch weiter unterteilt werden kann (Minnikin *et al.*, 1979; Lechevalier und Lechevalier, 1988; White *et al.*, 1996, Abraham *et al.*, 1997). Über die methodisch einfache Extraktion und Aufarbeitung der Fettsäuren, welche gaschromatographisch getrennt werden, können Fettsäureprofile von Einzelorganismen zur Identifizierung z.B. mit der Datenbank des „MIDI“-Systems (Sherlock<sup>®</sup> Microbial Identification Systems, Delaware, USA) oder Profile einer mikrobiellen Gemeinschaft erstellt werden. Diese ermöglichen Vergleiche zwischen unterschiedlichen Habitaten oder sich ändernden Umweltbedingungen (Navarrete und Peacock *et al.*, 2000). Da die PLFA einen nahezu konstanten Prozentsatz der bakteriellen Biomasse darstellen, werden sie auch zur Quantifizierung von Bakterien in einem Habitat verwendet (White *et al.*, 1979; Macnaughton *et al.*, 1999). Der schnelle Abbau der Phospholipide nach dem Zelltod bietet den Vorteil, dass nur lebende Organismen erfasst werden. Limitierend für diese Methode ist die natürliche Variabilität der Fettsäuren, mögliche Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung eines Organismus durch exogene Faktoren wie Substrate und Temperatur

sowie die Zellbeschaffenheit (Kieft *et al.*, 1994). Dennoch ist in komplexen Gemeinschaften die Identifizierung einzelner Mikroorganismen über spezifische Biomarker-Fettsäuren möglich.

Eine weitere Technik zur Identifizierung und Quantifizierung von Mikroorganismen bieten **immunologische Testsysteme** (Antikörpersonden). Diese Methode ist zur Identifizierung von pathogenen Bakterienstämmen seit Jahren etabliert und wird auch zur Analyse mikrobieller Ökosysteme genutzt (Macario *et al.*, 1985; Faude und Höfle, 1997). Das sogenannte „Westprinting“ ist eine Kombination aus Western-Blot, bei dem Gesamtzellproteine aufgetrennt werden, und immunologischem Fingerprinting. Die Detektion von Proteinen durch markierte Antikörper vereint bakterielle Fingerprints mit dem immunologischen Ansatz und schafft somit eine Identifizierungsmöglichkeit, die durch Variation der Spezifität des eingesetzten Serums gruppen-, gattungs- und artspezifisch eingesetzt werden kann (Tesar *et al.*, 1996).

Das derzeit größte Potential zur phylogenetischen und funktionalen Charakterisierung von Bakterien bietet die **Analyse der Desoxyribonukleinsäuren (DNA)**. Aus dem gesamten Genom hat sich zur taxonomischen Identifizierung die Sequenzanalyse des rRNA-Operons, bestehend aus 5S-, 16S- und 23S-rDNA, bewährt, da diese phylogenetischen Markermoleküle in allen Bakterien als essentielle Komponenten der Proteinbiosynthese vorkommen und über eine konservierte Molekülstruktur und –funktion verfügen. Die Primärstrukturen der 16S-rRNA-Gene enthalten stark konservierte, variable und hochvariable Regionen, die sich unabhängig voneinander entwickelt haben. Ausgehend von Arbeiten von Zuckerkanndl und Pauling (1965) erkannten Woese und Mitarbeiter (1987), dass der Grad der Ähnlichkeit der ribosomalen RNA-Gene verschiedener Organismen Auskunft über ihre phylogenetische Verwandtschaft gibt und Signatur-Sequenzen existieren, die für eine Art, Familie oder auch eine Gruppierung höherer Ordnung charakteristisch sind. Daher eignen sich 16S-rDNA-Sequenzen für eine taxonomische Eingruppierung von Domänen bis hin zur Artebene (Amann *et al.*, 1995). Der Vergleich der rRNA-Sequenzen von Mikroorganismen ermöglichte die Entwicklung einer phylogenetisch begründeten Taxonomie (Pace, 1997; Hugenholtz *et al.*, 1998), die nicht auf Reinkulturen beschränkt ist. Durch die Generierung von Klonbibliotheken und anschließender Sequenzierung der klonierten 16S rDNA-Fragmente ist heute eine kultivierungsunabhängige taxonomische Charakterisierung von Umweltproben möglich (Ward *et al.*, 1990; Stahl, 1997).

Basierend auf der Amplifikation des 16S-rRNA-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden zahlreiche molekularbiologische Methoden zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität eines Habitats entwickelt (Heuer und Smalla, 1997; Dahllöf, 2002). Molekulare Fingerabdrücke ermöglichen die zeit- und kostensparende Analyse einer Vielzahl von

mikrobiellen Gemeinschaften unter verschiedenen Bedingungen, ohne die Erstellung von Klonbibliotheken. Als Beispiele seien die Analyse von amplifizierten Sequenzabschnitten durch Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE; Muyzer *et al.*, 1993), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE; Rosenbaum und Riesner, 1987; Nübel *et al.*, 1996), Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP; Lee *et al.*, 1996; Schwieger und Tebbe, 1998) und Terminal-Restriction Eragment Length Polymorphism (T-RFLP; Liu *et al.*, 1997; Osborn *et al.*, 2000; Blackwood *et al.*, 2003) genannt. Die PCR-Produkte werden anhand ihrer Basensequenz-unterschiede je nach Schmelzverhalten (DGGE und TGGE), sekundärer Faltung der einzelsträngigen DNA (SSCP) oder nach enzymatischer Aufspaltung (T-RFLP) gelelektrophoretisch getrennt und charakterisiert. Zusätzlich ist mittels Sequenzanalyse die Zuordnung zu in Datenbanken organisierten Sequenzen von anderen Bakterien des 16S-rRNA-Gens möglich.

Die zusätzliche Betrachtung des genomischen Potentials einer mikrobiellen Gemeinschaft eines bestimmten Habitats (Metagenom) in Bezug auf **funktionale Gene** gibt Hinweise auf mögliche Abbauleistungen (Metcalf *et al.*, 2002). Die Identifizierung der beteiligten Mikroorganismen kann hier über Vergleiche mit isolierten Bakterien bzw. die gleichzeitige Sequenzierung des rRNA-Operons erfolgen.

Mittels PCR von extrahierter DNA werden alle Zellen detektiert, unabhängig von ihrem Vorkommen oder ihrer Aktivität im Habitat, da auch hungernde oder ruhende Zellen, wie Sporen, mit erfasst werden können. In der mikrobiellen Ökologie beziehen sich die Fragestellungen aber nicht allein auf die Identifizierung und Quantifizierung von Bakterien in einem Habitat und ihre räumliche Verteilung, sondern auch auf ihre metabolische Aktivität innerhalb der Gemeinschaft.

### 1.1.1 Aktivitätsanalysen in mikrobiellen Gemeinschaften

Seit langem ist bekannt, dass der Gehalt an **Ribonukleinsäuren (RNA)** einer Zelle abhängig ist vom physiologischen Zustand bzw. von der Aktivität des Organismus (Neidhardt und Magsanik, 1960; Nomura *et al.*, 1984; Kerhof und Ward, 1993), daher werden durch die Extraktion von RNA hauptsächlich metabolisch aktive Bakterien erfasst. Die reverse Transkription von RNA in cDNA erlaubt die Klonierung von rRNA, die mit den aus DNA erstellten Klonbibliotheken verglichen werden können und die aktive mikrobielle Population analysiert (Nogales *et al.*, 1999).

Eine etablierte Methode zur Beschreibung von aktiven Bakterien *in situ* ist die Detektion der ribosomalen RNA (**rRNA**) durch fluoreszenzmarkierte phylogenetische Sonden (Fluoreszenz in situ Hybridisierung FISH; Ward *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1990; Snaird *et al.*, 1997).

Erweiternd zu der Analyse der 16S-rRNA kann die Sequenz der 23S-rRNA mit einbezogen werden, welche über gleiche Voraussetzungen verfügt, aber durch ihre annähernd doppelt so lange Basensequenz ein höheres phylogenetisches Auflösungspotential bietet. Leider ist bis heute die verfügbare Datenbank mit 23S-rRNA-Sequenzen von Bakterien noch zu klein, um eine Alternative zur 16S-rRNA-Analyse zu bieten und ist daher vielmehr zur Ergänzung (Ward *et al.*, 2000) oder zur Entwicklung neuer phylogenetischer Sonden geeignet (Manz *et al.*, 1992; Trebesius *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 2001).

Die Hybridisierung von RNA, ihrer cDNA sowie weiterer Gene mit einer Vielzahl unterschiedlicher Nukleotid-Sonden wurde durch das Format der **Microarray**-Technik möglich. Sie erlaubt die parallele Analyse einer Vielzahl markierter Proben, sowohl von Reinkulturen als auch von mikrobiellen Gemeinschaften (Guschin *et al.*, 1997; Valinsky *et al.*, 2002; Dennis *et al.*, 2003). Die Detektion von Boten-RNA (mRNA) analysiert speziell das genetische Potential, welches von der Zelle unter den gegebenen Bedingungen exprimiert wird. Besonders die Kombination mehrerer molekularbiologischer Methoden wie z.B. DGGE-Fingerabdruck und Sequenzierung, RNA-DNA-Membran-Hybridisierung und DNA Microarray-Technik ermöglicht einen detaillierten Blick in eine mikrobielle Gemeinschaft (Koizumi *et al.*, 2002).

Innerhalb von mikrobiellen Gemeinschaften sind insbesondere die Stoffflüsse sowie die Positionen einzelner Bakteriengruppen im metabolischen Netzwerk von Bedeutung. Um die Zusammenhänge in einem komplexen mikrobiellen Habitat zu verstehen, wurde bereits in den 1960er Jahren die **Autoradiographie** in der mikrobiellen Ökologie als Werkzeug eingesetzt, bei der die Aufnahme von radioaktiv markierten Substraten durch Organismen detektiert wird (Brock und Brock, 1966). Heute kann die Mikroautoradiographie (MAR) mit der Hybridisierung fluoreszenz-markierter Sonden (FISH) gekoppelt und dadurch Bakterien mit einer bestimmten Substrataufnahme *in situ* identifiziert werden (Ouverney und Fuhrman, 1997; Lee *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2002). Eine Unterscheidung zwischen Aufnahme und tatsächlichem Einbau des Substrats in Biomoleküle, was eine Metabolisierung des Substrates beweist, ist aber nicht möglich. Ein größeres Potential zur Verfolgung eines Substrats in verschiedene Moleküle innerhalb der Zellen bietet die Markierung des Substrats mit stabilen Isotopen (Abraham *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Grundlagen der Isotopenmassenspektrometrie

Atome eines Elements können aufgrund unterschiedlicher Neutronenzahl verschiedene Massenzahlen aufweisen. Man bezeichnet sie nach einem Vorschlag des englischen Physikochemikers F. Soddy (1877-1965) als Isotope. Grundsätzlich unterscheidet man instabile bzw. metastabile Isotope (Radionuklide) von stabilen Isotopen. Durch die

unterschiedliche Anzahl an Neutronen variieren die Isotope eines Elements im Atomgewicht. Kohlenstoff kommt in der Natur als eine Mischung aus zwei stabilen Isotopen vor,  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$ , die zwar nicht über die gleichen physikalischen, aber aufgrund gleicher Anzahl von Elektronen und Protonen über sehr ähnliche chemische Eigenschaften verfügen.

Mit dem Isotopenmassenspektrometer (Isotopic Ratio Mass Spectrometer: IRMS) können geringe Massenunterschiede der verschiedenen Nuklide des Kohlenstoffs detektiert werden. Um den Isotopenwert von größeren Molekülen und Feststoffen bestimmen zu können, muss die Probe im Elementaranalysator (EA-IRMS) verbrannt werden, bevor Kohlendioxid in das IRMS geleitet werden kann. Dem IRMS kann aber auch ein Gaschromatograph vorgeschaltet werden, der durch einen Mikroverbrennungsofen, das sogenannte „Combustion Interface“, mit dem Massenspektrometer verbunden ist (GC-C-IRMS). Durch die Säule des Gaschromatographen werden die verschiedenen Verbindungen des Probengemisches aufgetrennt und erreichen nacheinander das IRMS. Das Combustion Interface bildet eine Einheit aus Oxidationsofen, in dem die Substanzen zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und Stickoxiden verbrannt werden, einem Reduktionsofen, in dem die Stickstoffverbindungen zu  $\text{N}_2$  reduziert werden und anschließender Nafion-Membran, an der das entstandene Wasser abgeschieden wird, ehe das Gas in das IRMS geleitet wird. Zusätzlich kann ein weiteres Massenspektrometer an den GC gekoppelt werden, welches die Identität und Reinheit der gemessenen Komponenten überprüft.

Kohlendioxid wird im IRMS in einem magnetischen Feld je nach Masse abgelenkt und in speziellen Cups die Menge an leichtem  $^{44}\text{CO}_2$  und schwerem  $^{45}\text{CO}_2$  und  $^{46}\text{CO}_2$  registriert, wobei letzteres das schwerere Sauerstoffisotop  $^{17}\text{O}$  enthält. Die Probe muss vollständig wasserfrei sein, um das Entstehen von  $\text{HCO}_2^+$ -Ionen zu vermeiden, die im IRMS mit der Masse 45 als  $^{13}\text{CO}_2$  identifiziert würden. Aus dem gleichen Grund müssen die Stickoxide zuvor zu elementarem Stickstoff reduziert werden, da  $\text{N}_2\text{O}$  mit der Masse 44 im IRMS zu  $\text{CO}_2$  gezählt werden würde. Aus der simultanen Registrierung und Integration der Massen 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ), 45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ,  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ ) und 46 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ ) können die Isotopenverhältnisse in sehr geringen Konzentrationen (nmol-Bereich) gemessen werden (Goodman und Brenna, 1992). Als Beurteilungsgrößen werden  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ -Verhältnisabweichung relativ zu einem Standard (PDB) mit der Einheit ‰ bestimmt (1).

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} = \left[ \frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right] * 1000 [\text{‰}] \quad (1)$$

$R_{\text{Probe}}$  : Isotopenverhältnis der Probe

$R_{\text{Standard}}$  : Isotopenverhältnis des PDB-Standards



Bei dem PDB-Standard handelt es sich um ein marines Calcium-Carbonat-Gestein aus South Carolina (USA) mit einem relativ hohen Anteil des schweren Isotops  $^{13}\text{C}$ . Das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis des daraus freigesetzten  $\text{CO}_2$  beträgt  $R_{\text{PDB}} = 0.0112372$  (Craig, 1957) equivalent zu einem Anteil an  $^{13}\text{C}$  von 1.1112328 atom%. In Bezug auf Kohlenstoff korrespondiert die Änderung von 0.0010989 atom% in der natürlichen Verteilung mit einer Differenz von 1 ‰ auf der  $\delta$ -Skala. Der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des PDB wurde als Nullwert gesetzt. Ist der  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwert einer Probe positiv, so ist sie mit dem schweren Isotop  $^{13}\text{C}$  stärker angereichert als PDB, ist der Wert negativ, so ist ihr Anteil an  $^{12}\text{C}$  größer.

Das erste Anwendungsgebiet der Isotopenmassenspektrometrie stellte in der Biogeochemie die Erdölanalyse dar (DeNiro und Epstein, 1977). Heute wird sie auch in der Geologie (Hayes, 1989), der Archäologie (Engel *et al.*, 1990), der Biochemie und Nahrungsmittelchemie (Mosandl, 1994), der Medizin (Metges, 1996) und der mikrobiellen Ökologie (Coffin, 1989) genutzt, um die Herkunft und auch die weitere Umsetzung von Molekülen und deren Bestandteilen zu analysieren. Die Isotopenanalyse trug z.B. mit der Identifizierung von methanogenen Bakterien in der Tiefsee zur Aufklärung der wichtigsten Substratflüsse in diesem Ökosystem bei (DeLong, 2000; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001). In Markierungsexperimenten kann das Verbleiben der schweren Isotope der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Wasserstoff detektiert werden, wobei Kohlenstoff durch seinen hohen prozentualen Anteil in organischen Verbindungen am häufigsten analysiert wird (Meier-Augenstein, 1997).

Stabile Isotope sind in zunehmender Auswahl von Verbindungen kommerziell erhältlich. Sie können dem Organismus in kleinsten Mengen als Substrat angeboten und nach ihrer Aufnahme mit Hilfe des IRMS in den verschiedenen Zellkomponenten und Molekülen nachgewiesen werden (Goodman und Brenna, 1992; Meier-Augenstein, 1997). Da ihnen nicht die Limitierungen durch kurze Halbwertszeiten der instabilen oder metastabilen Radioisotope, gesetzliche Bestimmungen und gesundheitliche Risiken im Umgang mit radioaktiven Isotopen auferlegt sind, können Markierungsexperimente sowohl im Labormaßstab als auch direkt in Tieren, Menschen oder in der Umwelt durchgeführt werden, (Demmelmaier *et al.*, 1997; Pouteau *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1997). Heute werden stabile Isotope vornehmlich in Sanierungsprojekten eingesetzt, um das Schicksal des abzubauenden Schadstoffs zu verfolgen. Es können sowohl die Isotopenwerte der Kontaminante, als auch die Transportrate in die Biomasse der Bakterien, in die Atmungsprodukte und in ausgeschiedene Stoffwechselprodukte bestimmt werden (O'Malley *et al.*, 1994), so dass Kohlenstoffkreisläufe auf molekularem Niveau aufzeigbar sind (Coffin *et al.*, 1990; Hare *et al.*, 1991; Silver *et al.*, 1994; Trust *et al.*, 1996). Die Isotopenanalyse der Biomarker-Moleküle Nukleinsäuren und Phospholipid-Fettsäuren wird hier zur spezifischen Identifizierung von mikrobiellen

Leistungen im biogeochemischen Kohlenstoff-Kreislauf genutzt (Boschker *et al.*, 1998, Pelz *et al.*, 2001, Pombo *et al.*, 2002).

Zur Interpretation der gemessenen Isotopenwerte ist, insbesondere bei der Betrachtung von natürlichen Isotopenverhältnissen, der Eintrag von Atomen während der Aufarbeitung der Proben und eine mögliche enzymatische Fraktionierung in der Biosynthese von Molekülen zu beachten (Meier-Augenstein, 1999). Bei letzterem wird bevorzugt das leichtere Isotop verwendet und somit im Biomarker-Molekül nicht das gleiche Isotopenverhältnis erreicht wie in der Ausgangsverbindung (Hayes, 2001). Die erste biologische isotopenspezifische Biosynthese-Diskriminierung wurde in den 60er-Jahren in Bezug auf die CO<sub>2</sub>-Fixierung von photosynthetisch aktiven Mikroorganismen und Pflanzen entdeckt (Abelson und Hoering, 1961). Eine Isotopenfraktionierung kann aber bei allen enzymatischen Prozessen, auch bei der Degradation von Schadstoffen, eine Rolle spielen und muss daher analysiert werden, bevor Isotopenmessungen z.B. während eines Sanierungsprojektes *in situ* durchgeführt werden (Meckenstock *et al.*, 1999; Morasch *et al.*, 2002). Bei Markierungsexperimenten sollte eine starke Isotopen-Diskriminierung in der Biosynthese der zu untersuchenden Biomarker-Moleküle ausgeschlossen werden (Abraham *et al.*, 1998 und 2001).

### 1.1.3 Separation von Biomarker-Molekülen vor der Isotopenanalyse

Zur erfolgreichen Durchführung eines Markierungsexperiments mit stabilen Isotopen müssen innerhalb der Gesamt-Biomasse einer bakteriellen Gemeinschaft Biomarker-Moleküle ausgewählt und isoliert werden, die Rückschlüsse auf die am Metabolismus beteiligten Bakteriengruppen erlauben.

In ökologischen Studien mit stabilen Isotopen hat sich die Analyse von Fettsäuren einer mikrobiellen Gemeinschaft etabliert (Tunlid und White, 1992; Boschker *et al.*, 2002), da diese mit geringem Aufwand aus einem Habitat extrahiert und mit einem an den Gaschromatographen gekoppelten Isotopenmassenspektrometer (GC-C-IRMS) analysiert werden können. Wird nach der Zugabe von <sup>13</sup>C-markiertem Substrat das schwere Isotop in diesen Fettsäuren nachgewiesen, kann so die Beteiligung der betreffenden Organismen am Abbau des Substrats demonstriert werden (Boschker *et al.*, 1998; Pelz *et al.*, 2001; Pombo *et al.*, 2002).

Eine bessere phylogenetische Auflösung als die Fettsäuren bieten die Nukleinsäuren, speziell die 16S- und 23S-rRNA (Woese *et al.*, 1987; Ludwig und Schleifer, 1999; Ward *et al.*, 2000). Zur Analyse der Isotopenwerte der rRNA von speziellen bakteriellen Gruppen innerhalb des Konsortiums ist nach einem Markierungsexperiment die Separation der spezifischen Nukleinsäuren erforderlich. Dies kann z.B. mittels einer Hybridisierung an phylogenetische

Oligonukleotid-Sonden erfolgen, die an ein festes oder bewegliches Trägermaterial wie paramagnetische Partikel (magnetic beads) gebunden sind (Albretsen *et al.*, 1990; Haukanes und Kvam, 1993; Zwirgmaier *et al.*, 2001).

Die Abtrennung von spezifischer rRNA aus einem RNA-Gemisch vor der Isotopenanalyse am EA-IRMS wurde kürzlich von MacGregor und Mitarbeitern (2002) mittels an phylogenetische Sonden gekoppelter paramagnetischer Partikel untersucht. Limitierend war hier insbesondere die Menge an separierter 16S rRNA, da für eine einzelne Isotopenanalyse eine Menge von 10 bis 100 µg RNA eingesetzt werden musste. Eine andere Separation von  $^{13}\text{C}$ -markierten und unmarkierten Nukleinsäuren mit anschließender Identifizierung der Bakterien gelang Radajewski und Mitarbeitern (2000) mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die markierte DNA wird über eine Polymerasekettenreaktion vervielfältigt, kloniert und sequenziert und so die Organismen identifiziert, die das schwere Isotop zur Synthese ihrer DNA genutzt hatten. Diese Methode wurde von Manefield und Mitarbeitern (2002 a) aufgenommen, welche statt DNA  $^{13}\text{C}$ -angereicherte rRNA abtrennten und analysierten.

Die Analyse von rRNA hat gegenüber der DNA den Vorteil, dass die Menge an rRNA innerhalb einer Zelle mit der Aktivität korreliert, sie als Bestandteil eines jeden Ribosoms in höherer Kopienzahl vorliegt als die DNA und außerhalb der Zelle schnell abgebaut wird (Kerkhof und Ward, 1993). Nachteil der Separation von  $^{13}\text{C}$ -markierten und unmarkierten Nukleinsäuren durch Zentrifugation ist lediglich der notwendig hohe Markierungsanteil des Substrats, der mindestens zu einer Anreicherung von 10 atom%  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{rRNA}} \geq 9000 \text{ ‰}$ ) in den Nukleinsäuren führen muss (Manefield *et al.*, 2002 b).

## **1.2 Von der bakteriellen Reinkultur über ein definiertes Konsortium zu komplexen Habitaten**

Mikroorganismen leben in der Natur in komplexen Habitaten, in denen eine Vielzahl von abiotischen und biotischen Faktoren Einfluss auf Wachstum und Stoffflüsse nehmen. Um gezielte Fragestellungen bezüglich einzelner Organismen zu bearbeiten, sind Experimente mit Reinkulturen im Labor notwendig. Interspezifische Stoffflüsse können über definierte Konsortien aus zwei oder mehreren Arten aufgeklärt werden (Nielsen *et al.*, 2000). Konsortien im Labor bieten den Vorteil, dass sie in einer kontinuierlichen Kultur unter definierbaren Umweltbedingungen, z.B. in einem Chemostaten, studiert werden können. Somit bietet sich eine modellhafte Überleitung zu natürlichen Habitaten, in denen komplexe Bedingungen herrschen. In dieser Arbeit werden neben bakteriellen Reinkulturen drei unterschiedliche mikrobielle Konsortien untersucht.

### 1.2.1 Definiertes mikrobielles Konsortium in kontinuierlicher Kultur

Das in dieser Arbeit analysierte definierte mikrobielle Konsortium besteht aus vier bakteriellen Stämmen, welche aus dem Sediment der Spittelwasser, einem mit Chlororganika hoch belasteten Nebenfluss im Elbeeinzugsgebiet im Bereich Bitterfeld, Sachsen-Anhalt stammen (Faude, 1995). In einer kontinuierlichen Kultur, dem Chemostaten, konnte eine stabile Bakteriengemeinschaft etabliert werden, welche 4-Cl-Salicylsäure, ein Zwischenprodukt des aeroben Abbaus von 4-Cl-Dibenzofuranen, als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen vermag.

Das Konsortium wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten in Bezug auf seine „Arbeitsteilung“ im Substratabbau (Pelz, 1999), seine Stabilität und seine Reaktionen auf Stressfaktoren analysiert (Rabenau und Stocchi, unveröffentlichte Daten). Es besteht aus vier verschiedenen Isolaten, die zu den Gattungen *Pseudomonas* (MT1 und MT4), *Empedobacter* (ehemals *Flavobacterium* MT2: Vandamme *et al.*, 1994) und *Achromobacter* (ehemals *Alcaligenes* MT3: Yabuuchi *et al.*, 1998) gehören und über 16S-rDNA-Gensequenz-Analyse identifiziert wurden (Faude, 1995). Mittels stammspezifischer poly- und monoklonaler Antikörper konnten prozentuale Anteile der einzelnen Stämme im Chemostaten ermittelt werden, wobei *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 die Hauptvertreter waren (Frech, 1996). Die spezifischen Antikörper wurden ebenso zur Separation der Zellen nach Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat genutzt und die Isotopenwerte der ubiquitären Palmitinsäure der Phospholipide analysiert (Pelz *et al.*, 1999). Voraussetzung für die Trennung der Stämme mittels Immunocapture sind jedoch spezifische Antikörper für die zu analysierenden Stämme, für deren Generierung bakterielle Isolate zur Verfügung stehen müssen. Daher wurden in dieser Arbeit kultivierungsunabhängig die 23S-rRNA Moleküle getrennt.

### 1.2.2 Biofilme auf polychlorierten Biphenylen (PCB)

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden komplexere Habitate untersucht, beginnend bei einem mikrobiellen Biofilm, welcher direkt auf einem Gemisch polychlorierter Biphenyle (PCB) gewachsen ist. Die Substanzklasse der polychlorierten Biphenyle besteht aus 209 verschiedenen Komponenten (Kongeneren), die sich im Grad der Chlorierung und der Anordnung der 1 bis 10 Chloratome an den zwei aromatischen Ringen unterscheiden. Ihre Hydrophobizität steigt mit zunehmender Chlorierung. Statt in Wasser sind sie gut in organischen Lösungsmitteln und Fetten löslich, was ihre Verteilung in der Umwelt maßgeblich beeinflusst.

Die industrielle Produktion von PCB begann in den 1930er-Jahren. Sie wurden wegen ihrer hohen thermischen und chemischen Stabilität, der geringen Flüchtigkeit, Beständigkeit

gegenüber Oxidationsmitteln und der extrem niedrigen elektrischen Leitfähigkeit in vielen Prozessen z.B. in Isolierflüssigkeiten in Hochspannungs-Transformatoren und Kondensatoren, in Weichmachern und Spezialklebstoffen oder als Hochdruck-Schmiermittel-Additiv eingesetzt. Weltweit wurden etwa 1.5 Millionen Tonnen PCB produziert und gelangten zumindest teilweise in die Umwelt (Rantanen, 1992). Die gleichen chemischen Eigenschaften, die so wertvoll für die Industrie waren, machten PCBs zu toxischen Umweltschadstoffen, die sich in der Nahrungskette anreicherten, was in den 1980er Jahren zum weltweiten Verbot der Produktion führte. Eine Bioakkumulation erfolgt vor allem in Leber-, Muskel- und Fettgewebe. Beim Menschen wurden nach chronischen Vergiftungen durch PCB-Gemische unter anderem Leber- und Nervensystem-Schäden, Blutbildveränderungen und Störungen des Immunsystems diagnostiziert (Kamrin und Ringer, 1994). Diskutiert wird auch die östrogene Wirkung einiger Kongenere sowie die krebserregenden Eigenschaften von hochchlorierten Biphenylen (Nicolopoulou-Stamati und Pitsos, 2001).

Der mikrobielle Abbau von PCB-Kongeneren ist sowohl aerob als auch anaerob möglich. Allgemein eignen sich vor allem hochchlorierte Kongenere für die anaerobe Dechlorierung, wobei die PCBs als Elektronenakzeptoren genutzt werden, während niedrigchlorierte Kongenere vor allem als Elektronendonoren beim aeroben Abbau dienen. Für den aeroben Abbau konnten im Labor eine Vielzahl von Mikroorganismen isoliert werden, die hauptsächlich als Gram-negative *Burkholderia*, *Pseudomonas* und *Sphingomonas* oder Gram-positive *Arthrobacter* und *Rhodococcus* identifiziert wurden (Gilbert und Crowley, 1997; Williams *et al.*, 1997; Kim und Picardal, 2001). Jedes Isolat zeigte ein Substratspektrum mit unterschiedlicher Bandbreite der abbaubaren PCB-Kongenere, wobei nur wenige Isolate beide aromatischen Ringe des Biphenyls aufbrechen konnten. Zumeist wird nur der geringer chlorierte Ring metabolisiert und Chlorbenzoate frei (Hrywna *et al.*, 1999), so dass in der Natur wahrscheinlich mindestens zwei Organismengruppen, eine für die PCB-Transformation und die zweite für den Chlorbenzoat-Abbau, die vollständige Metabolisierung der PCB-Kongenere ermöglichen (Nielsen *et al.*, 2000).

Nogales und Mitarbeiter (1999) analysierten einen mit PCBs hochbelasteten Sandboden eines Standortes nahe Wittenberg, Sachsen-Anhalt, um einen direkten Einblick in die mikrobielle Gemeinschaft während des PCB-Abbaus und die metabolisch aktiven Bakterien zu erhalten. Hauptsächlich wurden Proteobakterien, dominiert von *Burkholderia* spp. und Sequenzen ähnlich *Sphingomonas* spp. sowie Bakterien des *Holophaga-Acidobacterium* Phylum detektiert. Bakterien, die aus dem Boden mit Biphenyl angereichert und auf Biphenyl, 4-Chlorobiphenyl und verschiedenen chlorierten Benzoaten isoliert werden konnten, gehörten vor allem der Gattung *Burkholderia* an und zeigten eine hohe metabolische Diversität (Abraham *et al.*, 2003).

Ein neuer experimenteller Aufbau zur Entwicklung von PCB-abbauenden mikrobiellen Biofilmen aus dem oben beschriebenen Boden wurde von Lünsdorf und Mitarbeitern (2000 und 2001) beschrieben. In weiteren Ansätzen wurden die hydrophoben Träger mit kleinsten Tropfen eines PCB-Gemisches überzogen und die Biofilmbildung direkt auf dem hochkonzentrierten PCB-Gemisch beobachtet (Abraham *et al.*, 2002). In allen Fällen war das Biofilm-Konsortium in der Lage, auch höher chlorierte PCBs anzugreifen, welche keine der isolierten Bakterien als Kohlenstoffquelle nutzen konnten (Abraham *et al.*, 2003). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit mittels der Isotopenmarkierung die aktive Degradation von PCB durch die Biofilm-Gemeinschaft gezeigt und die beteiligten Bakteriengruppen identifiziert werden.

### 1.2.3 Belebtschlamm als komplexes biologisches System

Gemeinschaften aus Mikroorganismen im Klärschlamm oder Belebtschlamm sind hauptsächlich verantwortlich für das Entfernen von organischen Verbindungen aus dem Abwasser und bilden somit das aktive Zentrum einer Kläranlage. Der Belebtschlamm zeichnet sich durch hohe Zelldichten und hohe mikrobielle Diversität aus (Amann *et al.*, 1996) und wird traditionell mittels Mikroskopie oder durch kultivierungsabhängige Methoden im Labor analysiert (Lorenz und Lorenz, 1995). Einen besseren Einblick in die mikrobielle Zusammensetzung von Belebtschlamm erlauben kultivierungsunabhängige Methoden, wie die Klonierung der 16S-rRNA oder die *in situ* Hybridisierung (FISH) mit markierten phylogenetischen Oligonukleotidsonden (Snaird *et al.*, 1997, Wagner und Loy, 2002).

Da Abwasser keine konstante chemische Zusammensetzung aufweist, ist je nach Herkunft des Wassers auch Kontakt des Belebtschlammes mit aromatischen und/oder chlorierten organischen Verbindungen möglich. Hier ist von Interesse, welche mikrobiellen Gruppen zum Abbau dieser Verbindungen befähigt sind (Stoffels *et al.*, 1998) und so bei erhöhten Konzentrationen die Gemeinschaft vor einer Vergiftung bewahren. Viele bakterielle Isolate, z.B. für den Phenol-Abbau, konnten identifiziert und isoliert werden (Erb *et al.*, 1997; Whiteley *et al.*, 2001), aber kultivierungsunabhängige Methoden, wie die Markierung von Substraten mit radioaktiven Isotopen (MAR) in Kombination mit der Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden (FISH), verschaffen einen direkteren Einblick in die Substrataufnahme von spezifischen Bakteriengruppen innerhalb des Belebtschlammes (Ouverney und Fuhrman, 1999). Hier wurde bisher die Aufnahme von markiertem Acetat, Glucose, Butyrat und Bicarbonat insbesondere in Bezug auf fadenförmige Bakterien analysiert (Nielsen *et al.*, 2003). *In situ* ist der Nachweis von Phenol- oder 4-Cl-Catechol-Abbauern in Belebtschlamm noch nicht erfolgt, was in dieser Arbeit mit stabilen Isotopen erfolgen soll.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurden verschiedenste Methoden entwickelt, um komplexe mikrobielle Gemeinschaften *in situ* zu beschreiben und aktive Organismen zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit soll das stabile Isotop  $^{13}\text{C}$  genutzt werden, um den Substratfluss in unterschiedlichen bakteriellen Gemeinschaften nachzuvollziehen und in Kombination mit kultivierungsunabhängigen Methoden die am Abbau von chlorierten Organika beteiligten Bakteriengruppen zu identifizieren.

Im ersten Teil der Arbeit wird ein definiertes Konsortium aus vier bakteriellen Stämmen betrachtet. Die 23S-rRNA-Moleküle der einzelnen Stämme sollen über eine Hybridisierung mit spezifischen Sonden, welche zuvor mittels 23S-rDNA-Sequenzanalyse generiert wurden, separiert und die Isotopenwerte der rRNA bestimmt werden. Parallel müssen die Bestimmungsgrenzen des IRMS ermittelt werden, bevor Experimente mit einzelnen Stämmen des Konsortiums in Batchkulturen durchgeführt werden. Anschließend wird ein Chemostat mit den vier Stämmen angeimpft und diese Bakterien in einer kontinuierlichen Kultur angezogen. Die Zellzahl und die prozentuale Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft wird mit Hilfe mikroskopischer und immunologischer Methoden verfolgt.

Nach Zugabe einer geringen Menge von vollständig mit  $^{13}\text{C}$ -Atomen markiertem (uniformly labelled)  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  wird der Einbau der schweren Isotope in die Biomasse der Bakterien und speziell in die Ribonukleinsäuren verfolgt. Die Ribonukleinsäuren (Gesamt-RNA) des Bakteriengemisches werden extrahiert und mit Hilfe von Oligonukleotid-Sonden wird die 23S-rRNA spezifisch isoliert. Schließlich sollen die  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte am IRMS bestimmt und so Rückschlüsse auf die am Substratabbau beteiligten Bakterien gezogen werden. Zusätzlich werden die Anreicherungen mit  $^{13}\text{C}$  in weiteren Biomolekülen, wie Aminosäuren und Fettsäuren der Phospho- und Glykolipide, gemessen, um den Abbau des Substrats zu dokumentieren. Hier ist eine mögliche Isotopendiskriminierung sowie kinetische Einflüsse in der Biosynthese der jeweiligen Moleküle zu beachten. Die allgemeine Vorgehensweise zur Isotopenanalyse der einzelnen Komponenten des Konsortiums ist in Abb. 1.1 dargestellt.

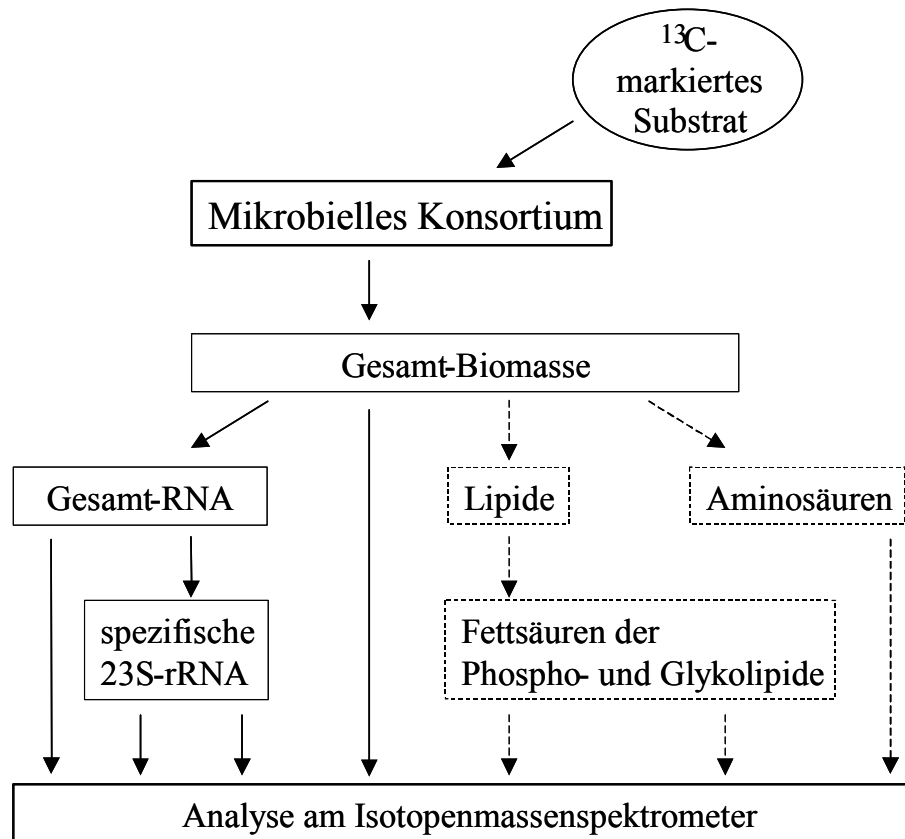


Abb. 1.1: Allgemeine Vorgehensweise zur Isotopenanalyse der einzelnen Komponenten eines mikrobiellen Konsortiums. Nach Zugabe von <sup>13</sup>C-markiertem Substrat wird die Isotopenverteilung in der Gesamt-Biomasse gemessen, die Gesamt-RNA extrahiert und zusammen mit der durch phylogenetische Sonden separierten ribosomalen RNA (spezifische 23S-rRNA) am IRMS analysiert. Zusätzlich werden die Lipide extrahiert und die Isotopenaufnahme in die Fettsäuren der Phospho- und Glykolipide sowie in die Aminosäuren massenspektrometrisch untersucht. Die durch gestrichelte Pfeile markierten Messungen werden nicht bei allen Experimenten durchgeführt, da besonders die rRNA-Analyse von Interesse ist.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgt die Anwendung der Methode in komplexen biologischen Systemen: Den auf PCB gewachsenen Biofilmen wird [U-<sup>13</sup>C]-2,2'-Dichlorobiphenyl und dem Belebtschlamm [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol, [U-<sup>13</sup>C]-Phenol, [U-<sup>13</sup>C]-Histidin und [U-<sup>13</sup>C]-Acetat zugegeben. Der Nachweis einer Isotopenanreicherung in den verschiedenen Biomarker-Molekülen rRNA und Phospholipid-Fettsäuren dient als Beweis für die aktive Metabolisierung der markierten Substrate der durch die Biomarker charakterisierten Bakteriengruppen.

Die Untersuchungen sollen zudem zeigen, ob die Isotopenanreicherungen in spezifisch separierten rRNA-Molekülen durch ihr hohes phylogenetisches Potential eine aussagekräftigere Alternative zu der Isotopenanalyse von Phospholipid-Fettsäuren bietet.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte

Bead-Beater:	B.Braun Biotech, Melsungen
Elementaranalysator:	EA 1108, Fisons, Italien
Epifluoreszenzmikroskop:	Axiophot Zeiss, Jena
Entwicklungsgerät:	Curix 60, Agfa, Leverkusen
Gaschromatographen (GC):	HP 5890 Serie II und Agilent 6890N, Agilent Technologies, Waldbron
GC-Massenspektrometer:	HP 5890 Serie II mit HP MS-Engine 5989A, Agilent Technologies, Waldbron und GC-Q, Finnigan Mat, jetzt Thermo Finnigan, Bremen
Geldokumentation:	E.A.S.Y. System, Herolab, Wiesloch
Gelelektrophoresekammern:	Gibco BRL horizon 58, Eggenstein, Subcell GT Basic, BioRad, München
Heizplatte:	Thermoplate "S", Desaga GmbH, Wiesloch
Hybridisierungssofen:	Mini Hybridisation oven, Appligene, Heidelberg
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph (HPLC):	Waters 2690 Separation Module mit Waters PDA 996 Detector, Waters GmbH, Eschborn
Isotopenmassenspektrometer:	MAT 252, Finnigan Mat, jetzt Thermo Finnigan, Bremen
Kühlzentrifuge:	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau
MALDI-Massenspektrometer	Ultraflex <sup>TM</sup> MALDI-TOF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen)
PCR-Thermocycler:	Gene Amp 9600, Perkin Elmer, USA; Eppendorf Mastercycler gradient, Hamburg und Landgraf Thermocycler, Langenhagen
pH-Meter:	pH 325/SET, WTW, Weilheim
Rotationsverdampfer:	Rotavapor R-114, Büchi, CH
SSCP-Apparatur	SSCP-Apparatur 2010-001 Macrophor Electrophoresis Unit, LKB Bromma, Bromma, S
Sequenzierer:	ABI PRISM System 373 und 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, Californien, USA
Spannungsgerät:	PowerPack 300, BioRad, München
Spektralphotometer:	Spectomic 601, Milton Roy Company, F
sterile Impfbank:	HeraSafe, Heraeus Instruments, Hanau
Thermoblock mit Ausblaseinheit:	TR-L288, Liebisch, Bielefeld
Tischinkubator:	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Tischuniversalschüttler:	SM25, Bühler-Schüttler, J. Otto-GmbH, Hechingen

---

Tischzentrifuge:	Centrifuge 5417 C, Eppendorf
Über-Kopf-Schüttler:	Reax2, Heidolph Instruments, Schwabach
Ultraschallgerät:	Ultraschall Dislocator Labsonic U, B.Braun, USA
UV-Transilluminator:	Chromato-Vue Transilluminator, UVP, USA
UV-Quervernetzungsgerät:	UV-Stratalinker 1800, Stragene, Californien, USA
Vacuum-Konzentrator:	Speedvac Concentrator 5301, Eppendorf und DNA Speedvac 120, Thermo Savant, USA

## **2.2 Analyse von Substraten und Metaboliten**

### **2.2.1 Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC**

Mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC = High performance liquid chromatography) wurden Substrate und Metabolite über ihre Retentionszeit und das Absorptionsspektrum identifiziert, die Konzentration im Chemostaten bestimmt und über die Zeit mitverfolgt. Die steril filtrierte Probe wurde in der HPLC (2690 Waters, Milford, USA) in einen Fluss ( $0.25 \text{ ml min}^{-1}$ ) von Wasser und Methanol (je + 0.1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) injiziert und über eine Microbore-Säule (RP-18, 12.5 cm, 2 mm Innendurchmesser) aufgetrennt. Das Laufmittelverhältnis von Wasser zu Methanol veränderte sich während des Laufes von 80:20 ( $t = 0 \text{ min}$ ) über 78:22 ( $t = 12 \text{ min}$ ) auf 20:80 ( $t = 25 \text{ min}$  bis  $30 \text{ min}$ ). Die Detektion der getrennten Substanzen Catechol, 4-Cl-Catechol, Maleylacetat, cis-Acetylacrylat und 4-Cl-Salicylat erfolgte bei 210 nm und von Protoanemonin, trans- und cis-Dienlacton bei 260 nm über einen Photodiodenarray (PDA)-Detektor. Zusätzlich wurde die Verbindung 3-Cl-Benzoat, welches zuvor in Spuren im Substrat 4-Cl-Salicylat nachgewiesen wurde (Pelz und Rabenau, persönliche Mitteilungen), bei 210 nm gemessen. Das Absorptionsspektrum wurde an den angeschlossenen PC weitergegeben und mit der „Millenium“-Software (Waters) ausgewertet. Zusammen mit der charakteristischen Retentionszeit (Aufnahmeintervall von 0 bis 30 min) war so eine Identifizierung der Substanzen möglich. Zusätzlich konnte mit Hilfe von Standardproben unterschiedlicher Konzentrationen die Menge einer Probe über die Signalfläche errechnet werden und so eine Ab- oder Zunahme der Substanzen dokumentiert werden.

#### **2.2.2 Photometrische Analyse von Metaboliten**

Die Verbindung Hydroxymuconsäuresemialdehyd (HMSA), welche beim Abbau von Chlor-Catechol bzw. 4-Cl-Salicylat als Metabolit gebildet wird (Wieser *et al.*, 1994), konnte durch eine photometrische Messung bei 375 nm (SPECTRONIC 601, Milton Roy Comp., USA) nachgewiesen werden. Die optische Dichte bei 375 nm von 1.0 entspricht der Konzentration von 30 mM HMSA und nimmt linear ab.

## 2.3 Bakterien

### 2.3.1 Chemostaten-Konsortium

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein definiertes Konsortium aus vier Bakterien in kontinuierlicher Kultur untersucht. Die Bakterien stammen aus dem Sediment der Spittelwasser, einem mit Chlororganika hochbelasteten Nebenfluss im Elbeeinzugsgebiet im Bereich Bitterfeld, Sachsen Anhalt (Faude, 1995). Sie wurden mit dem Substrat 4-Cl-Salicylat in kontinuierlicher Kultur (Chemostat) selektioniert und isoliert. In Tab. 2.1 sind die Bakterienstämme aufgeführt, die das Chemostaten-Konsortium bilden. Im Jahr 1998 erfolgte die Umbenennung vieler Vertreter der Gattung *Alcaligenes* zu *Achromobacter* (Yabuuchi *et al.*, 1998) und durch in der Datenbank neu hinzugekommene Sequenzen wurde *Flavobacterium* sp. MT2 der Gattung *Empedobacter* (Vandamme *et al.*, 1994) zugeordnet. Die Stämme MT1 und MT4 wurden bereits 1995 als Stämme der Gattung *Pseudomonas* identifiziert (Faude, 1995).

Tab. 2.1: Bakterienstämme des Konsortiums im Chemostaten und phylogenetische Einordnung über die 16S-rDNA-Sequenz (Heuer, unveröffentlichte Daten).

Stamm	Anzahl der Basen	Sequenz-homologie (%)	nächstähnliche 16S rDNA-Sequenz in der Datenbank
<i>Pseudomonas</i> sp. MT1	1491	99.36	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 11250 Biotype B
<i>Empedobacter</i> sp. MT2	1452	97.14	<i>Empedobacter brevis</i> IAM 14197
<i>Achromobacter</i> sp. MT3	1472	99.93	<i>Achromobacter xylosoxidans subsp. xylosoxidans</i> ATCC 27061
<i>Pseudomonas</i> sp. MT4	1492	99.87	<i>Pseudomonas veronii</i> CIP 104663 (T)

### 2.3.2 Bakterien aus PCB-belastetem Boden

Der Boden, der als Inoculum für die Biofilme genutzt wurde, stammt von der Deponie eines ehemaligen Raketenstützpunktes der Westgruppe der sowjetischen Armee im Raum Wittenberg in Sachsen-Anhalt. Dieser Standort liegt in einem sandigen Heidegebiet mit wenig Tonbeimischungen und einem pH-Wert von 4.0 bis 4.5 und wurde durch auslaufende Kondensatoren stark mit polychlorierten Biphenylen (PCB) verunreinigt (Nogales *et al.*, 1999). Der in dieser Arbeit genutzte Boden besaß eine durchschnittlichen Kontamination von 13.5 g kg<sup>-1</sup> Boden (Boden 7, Abraham *et al.*, 2003).

Biofilme wurden direkt aus dem PCB-belasteten Boden angezogen. Für die Fettsäure-Analyse wurden zusätzlich die Fettsäureprofile von einigen bakteriellen Isolaten aus dem Boden bei

Wittenberg sowie von vorangegangenen Biofilmen (beschrieben bei Abraham *et al.*, 2003 und Lünsdorf *et al.*, 2000) hinzugezogen, die in Tab. 2.2 aufgeführt sind.

Tab. 2.2: Bakterielle Isolate aus PCB-kontaminiertem Boden (7, 31, 54, B und C) und von Biofilmen auf Arochlor 1242 (A1242), welche diesen Boden als Inoculum hatten. Die PCB-Konzentration in Boden C entsprach Boden 7 (13.5 g kg<sup>-1</sup>), in Boden 31 war die mittlere PCB-Konzentration 1.8 g kg<sup>-1</sup> und in Boden 54 (24 g kg<sup>-1</sup>). Das Substrat ist die C-Quelle, auf der die Bakterien isoliert wurden. Biphenyl wurde über die Gasphase zur Kultur gegeben, die anderen Substrate waren in der Konzentration 1 g L<sup>-1</sup> dem Agar zugefügt.

Gattung	Isolat	Quelle	Substrat
<i>Burkholderia</i>	W553	Boden 7	2-Cl-Benzooat
	W555	Boden 7	2-Cl-Benzooat
	W568	Boden 7	4-Cl-Biphenyl
	W570	Boden 7	4-Cl-Biphenyl
	W571	Boden 7	4-Cl-Biphenyl
	W573	Boden 7	4-Cl-Biphenyl
	W576	Boden 7	Biphenyl
	W577	Boden 7	Biphenyl
	W583	Boden 7	Biphenyl
	W604	Boden 31	4-Cl-Biphenyl
	W608	Boden 31	3,4-Di-Cl-Benzooat
	W610	Boden 31	3,4-Di-Cl-Benzooat
	W612	Boden 31	3,4-Di-Cl-Benzooat
	W616	Boden 31	3,4-Di-Cl-Benzooat
	W619	Boden 31	3,4-Di-Cl-Benzooat
	W798	Boden 31	Medium 269 pH 3.5*
	W897	Boden 54	2,3,5-Tri-Cl-Benzooat
<i>Arthrobacter</i>	W584	Boden 7	Biphenyl
	W586	Boden 7	Biphenyl
<i>Burkholderia</i>	W839	Boden B, Biofilm auf A1242	1/10 R2A pH 5**
	W853	Boden C, Biofilm auf A1242	1/10 R2A pH 5
	W854	Boden C, Biofilm auf A1242	1/10 R2A pH 5
	W861	Boden 54, Biofilm auf A1242	1/10 R2A pH 5
	W864	Boden 54, Biofilm auf A1242	1/10 R2A pH 5
	W869	Boden 54, Biofilm auf A1242	1/10 R2A pH 5
<i>Methylobacterium</i>	W1220	Boden C, Biofilm auf A1242 und Dibenzofuran	1/10 R2A pH 5
	W1226	Boden C, Biofilm auf A1242 und Dibenzofuran	1/10 R2A pH 5
	W1233	Boden 54, Biofilm auf A1242 und Dibenzofuran	1/10 R2A pH 5
<i>Wittenbergia</i>	W1210	Boden C, Biofilm auf A1242 und Dibenzofuran	1/10 R2A pH 5
	W1229	Boden 54, Biofilm auf A1242 und Dibenzofuran	1/10 R2A pH 5
	W1237	Boden 54, Biofilm auf A1242 und Dibenzofuran	1/10 R2A pH 5

\* Acidophilum Medium 269 pH 3.5 aus der Medienliste der DSMZ (Braunschweig)

\*\* Medium 1/10 R2A pH 5: Fertigmmedium R2A von DIFCO Laboratories (Detroit, USA) 1/10 verdünnt

### 2.3.3 Belebtschlamm als mikrobielles System

Der in dieser Arbeit genutzte Belebtschlamm stammte aus der kommunalen Klärwerk Steinhof in Braunschweig Watenbüttel. Mittels einer Schöpfkelle wurden 5 L aus dem Belebungsbecken entnommen, im Labor gut durchmischt und je 1 L in die Chemostatengefäße gefüllt (Kap. 2.4.3). Die Gesamtanzahl kultivierbarer Bakterien wurde durch nicht selektives Plattieren auf kommerziell erhältlichem R2A-Agar (Fertigmedium von DIFCO Laboratories, Detroit, USA) ermittelt, welchem zur Vermeidung von Pilzwachstum  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  Cycloheximid zugegeben wurde. Zusätzlich wurde regelmäßig die Beschaffenheit der Klärschlammflocken mikroskopisch bei 100-, 400- und 1000-facher Vergrößerung (Axioskop, Zeiss) kontrolliert.

## 2.4 Bakterienwachstum und Zellzahl

Die angeführten Nährmedien wurden mit frisch destilliertem Wasser angesetzt und der pH-Wert bei Bedarf mit 1N NaOH bzw. HCl eingestellt.

### LB-Medium (Luria-Bertani)

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml

### EM-Medium (Ed Moore)

Trypton	20 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	5 g	
Glucose	5 g	
(Agar	15 g)	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	pH 7.2

Das EM-Medium wurde in Kolben autoklaviert und zur ersten Anzucht von Reinkulturen verwendet oder nach Zusatz von  $15 \text{ g L}^{-1}$  Agar in Platten ausgegossen und zur optischen Kontrolle von Isolaten genutzt. Anschließend wurden die Kulturen weiter in flüssigem Medium in Erlenmeyerkolben angezogen.

Das Bakterienwachstum konnte über die optische Dichte bei 600 nm im Photometer (SPECTRONIC 601, Milton Roy Comp., USA) gegen die optische Dichte von steril filtriertem Medium verfolgt werden. Zusätzlich wurde die Zellzahl mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung am Zeiss Axioskop, mit Hilfe einer Bakterien-Zählkammer (Thoma) ermittelt. Um eine weitere Vermehrung der Bakterien nach der Probenahme im Reaktionsgefäß zu verhindern, wurde 1 ml Probe mit 60  $\mu\text{l}$  37 %-Formaldehyd-Lösung

fixiert. Anschließend wurde die Bakterienanzahl von mindestens 25 Kleinquadraten ausgezählt und der durchschnittliche Wert mit dem Kammerfaktor von  $2 \times 10^7$  und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Zur Feststellung der Lebendzellzahl (cfu = colony forming units) wurden Verdünnungsreihen der Probe auf Platten von nichtselektivem Medium (LB oder EM) ausgestrichen und über 12 bis 24 h bei 30°C inkubiert.

#### 2.4.1 Bakterienwachstum in Batch-Kulturen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in 500 ml EM-Vollmedium oder 500 ml Mineralmedium mit 1 mM Acetat oder Glucose als einziger Kohlenstoff-Quelle in einem 1 L-Erlenmeierkolben, das mit jeweils 20 ml Vorkultur inokuliert wurde. Die Bakterien wurden bei 30°C und  $100 \text{ U min}^{-1}$  (GIO, GYROTOR®<sup>®</sup>, New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA) inkubiert und nach 12 h (z.B. *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4) bzw. 24 h (z.B. *Empedobacter* sp. MT2 und *Achromobacter* sp. MT3) in der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet.

Die Kultur wurde mit einem Ausstrich auf EM-Platten und mittels einer mikroskopischen Probe auf Reinheit überprüft und über die optische Dichte bei 600 nm die Zelldichte bestimmt. Anschließend wurde die Bakterienmasse 15 min bei  $7200 \times g$  im 1 L-Zentrifugengefäß zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 10 mM Phosphatpuffer (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0) gewaschen, in ein 250 ml-Zentrifugengefäß überführt und 15 min bei  $16\,200 \times g$  herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in einem 50 ml-Zentrifugengefäß erneut 15 min bei  $16\,200 \times g$  zentrifugiert. Das Bakterienpellet der Reinkulturen wurde entweder in PBS-Puffer aufgenommen, um als Inoculum für einen Chemostaten zu dienen, oder bis zur weiteren Analyse der Zellbestandteile bei -20°C oder -70°C eingefroren.

#### PBS (Phosphat buffered saline)

NaCl	8.0 g	
KCl	0.2 g	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.44 g	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.24 g	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 1000 ml	pH 7.4

#### 2.4.2 Bakterienwachstum im Chemostaten

Die vier Stämme wurden in einer Batch-Kultur in EM-Vollmedium angezogen und abgeerntet. Zusätzlich zu dem Medium wurde dem Stamm *Pseudomonas* MT1 0.5 mM 4-Chlorsalicylat, *Achromobacter* sp. MT3 0.5 mM 4-Chlorcatechol und *Empedobacter* sp. MT2 0.5 mM Catechol gegeben, um die Enzyme für den späteren Abbauweg von 4-Chlorsalicylat im Chemostaten zu induzieren. Nach den Zentrifugations- und Waschschritten wurde erneut

die optische Dichte bestimmt und nur so viele Zellen eines jeden Stammes zu 2 x 500 ml neuem Minimalmedium mit 1 mM 4-Cl-Salicylat als einziger Kohlenstoffquelle gegeben, dass die optische Dichte von etwa 0.04 erreicht wurde. Die so entstandene Mischkultur wurde 24 h bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert, bis sich ihre optische Dichte erhöht hatte. Anschließend wurde die Kultur unter einer Sterilbank in das autoklavierte Chemostaten-Glasgefäß (Volumen von 1.0 oder 2.5 L) überführt.

### **Chemostaten-Mineralmedium (M9)**

Mineralien-Pufferlösung	100 ml	
Magnesium-Lsg.	0.67 ml	
Eisen-EDTA-Lsg.	4 ml	
Spurenelementlösung	1.33 ml	
4-Cl-Salicylat	1 - 5 mM	(steril filtriert)
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	pH 7.0

### **Mineralien-Pufferlösung**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	87.78 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12.37 g	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	(autoklaviert)

### **Magnesium-Lsg.**

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	246.48 g	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	(autoklaviert)

### **Eisen-EDTA-Lsg.**

FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	3.20 g	
EDTA	12.37 g	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	(steril filtriert)

### **Spurenelementlösung**

MgO	10.75 g	
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	4.5 g	
CaCO <sub>3</sub>	2.0 g	
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1.44 g	
MnSO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.87 g	
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.28 g	
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.25 g	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.06 g	
konz. HCl	51.3 ml	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 1000 ml	(steril filtriert)

Das Volumen der Chemostaten betrug 1000 ml bzw. 2500 ml mit je 1 mM 4 Cl-Salicylat als C-Quelle. Das Medien-Vorratsgefäß wurde mit 10 L sterilem Medium gefüllt, in dem eine Substratkonzentration von 5 mM eingestellt war.

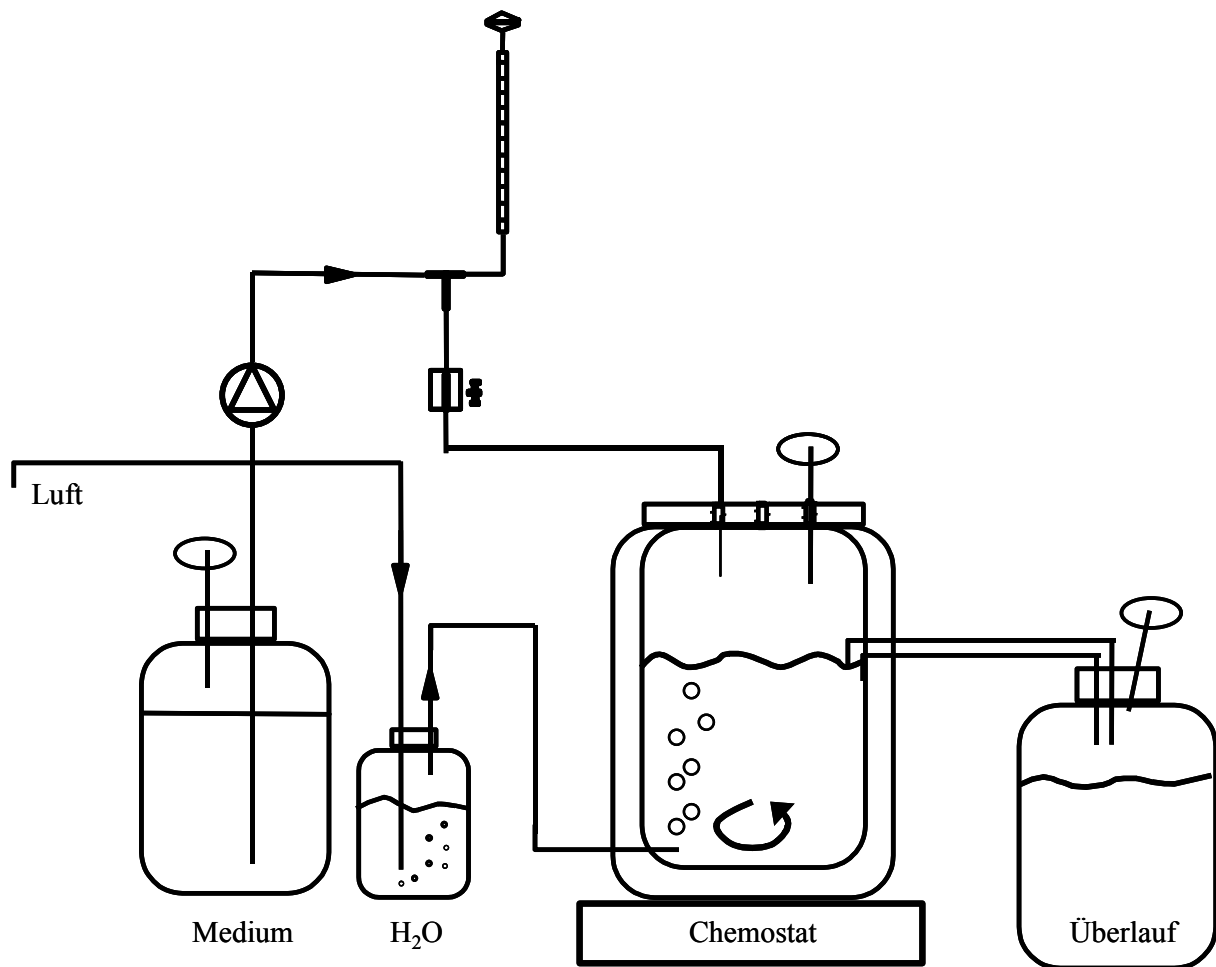


Abb. 2.1: Skizze des Chemostaten-Aufbaus mit Mediengefäß, Kultur- und Auffanggefäß (Überlauf).

Der Aufbau eines Chemostaten ist in Abb. 2.2 gezeigt. Der Reaktor, bestehend aus einem oder mehreren parallel geschalteten Glas-Kulturgefäßen, in denen die Bakterien wuchsen, wurde in einem Klimaschrank bei konstanter Temperatur von 30°C betrieben. Steriles Medium wurde kontinuierlich aus einem Vorratsgefäß (Schott, 10 L) mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Watson Marlow, England) zugefügt. Der genaue Volumenstrom wurde mit Hilfe einer angeschlossenen Pipette, die als Steigrohr diente, gemessen.

Die Medienzugabe von 5 mM 4-Chlorsalicylat erfolgte zu Beginn des Wachstums im Chemostaten mit 0.5 ml h<sup>-1</sup> und wurde allmählich auf 3.3 ml h<sup>-1</sup> gesteigert. Der Substratabbau wurde über Flüssigkeitschromatographie (HPLC, Kap. 2.2.1) verfolgt, um eine Anreicherung des in höheren Konzentrationen toxischen Substrates zu vermeiden und gegebenenfalls den Medienzufuß zu schließen. Die Kultur wurde permanent mit einem teflummantelten Magneten vermischt und mit Hilfe eines Flussmessers (FP-1/4-10-G-5, Baily-Fischer & Porter) mit sauerstoffhaltiger Luft nach Anfeuchtung in einer mit deionisiertem Wasser gefüllten Gaswaschflasche mit einem Volumenstrom von 2.6 L min<sup>-1</sup> belüftet.



Bei Probennahmen von je 5 ml aus dem Chemostaten-Glasgefäß wurde die optische Dichte der Kultur gegen den Nullwert des filtrierten Mediums gemessen, 1 ml der Probe mit Formaldehyd fixiert, regelmäßig die genaue Zellzahl mikroskopisch bestimmt und die Konzentration des Substrates und anderer Sekundärmetabolite photometrisch und mittels HPLC gemessen (Kap. 2.2).

### 2.4.3 Wachstum von Belebtschlamm im Chemostaten

Für die weitere Kultivierung des Belebtschlammes im Labor wurde synthetisches Abwasser (LSSP-Medium) für den Belebtschlamm 25-fach konzentriert angesetzt, wobei Natriumhydrogencarbonat und Glucose getrennt mit der Konzentration von 1 M angesetzt und autoklaviert wurden.

#### LSSP (synthetisches Abwasser)

Casiton	120 mg
Fleischextrakt	164 mg
Harnstoff	30 mg
NaCl	10 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	42 mg
NaHCO <sub>3</sub>	330 mg
Glucose	132 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Der Chemostatenaufbau für Belebtschlamm war ähnlich dem in Kap. 2.4.2 beschriebenen. Zwei Kulturgefäße mit einem Probenvolumen von einem Liter waren parallel geschaltet mit Belebtschlamm gefüllt worden. Der Belebtschlamm wurde über Schlauchpumpen (Watson Marlow) mit 25-fach konzentriertem LSSP-Medium versorgt (Zulauf von 3.5 ml h<sup>-1</sup>). Es erfolgte eine Zufütterung einer 1 mM 4-Cl-Catechol-Lösung mit einem Zulauf von 5.9 ml h<sup>-1</sup>. Die Verdünnungsrate des Belebtschlammes lag bei 0.23, was einem kompletten Volumenaustausch in 4.4 Tagen entspricht. Die Belüftung des Belebtschlammes im Kulturgefäß wurde sowohl durch die Luftzufuhr vom Grund aus (wie in Kap. 2.4.2), als auch über einen Sprudelstein in der Mitte des Gefäßes sichergestellt. Gemischt wurde der Schlamm mit einem teflonisierten Magnetrührkern. Beide Kulturgefäße besaßen ein eigenes Auffanggefäß mit einem Volumen von 10 L, in dem sich der Belebtschlamm absetzen und wieder entnommen werden konnte, um in das Kulturgefäß zurückgeführt zu werden. Ein nachgeschaltetes Überlaufgefäß mit 20 L Volumen war für beide Kulturgefäße an das Auffang- bzw. Absetzgefäß angeschlossen. Nach Befüllung der Anlage wurden regelmäßig Proben von 5 bis 10 ml entnommen und die biologische Zusammensetzung des Belebtschlammes mikroskopisch (Axioskop, Zeiss) bei 100-, 400- und 1000-facher Vergrößerung kontrolliert.

#### 2.4.4 Biofilmentwicklung auf PCB-beschichteten Trägern

Als Träger für den Biofilm, der sich auf polychlorierten Biphenylen ansiedeln sollte, wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm und einer Höhe von 15 mm aus der Zellkulturtechnik (Nalge Nunc International, USA) genutzt, die aus dem acetonbeständigen Kunststoff Permanox bestanden. Das PCB-Gemisch Arochlor 1242 (Promochem, Teddington, GB) wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Isopentan (1:1.5, v:v) gelöst und je 250 µl Lösungsmittel mit 4 µl Arochlor-Lösung auf einen fettfreien Träger aufgetropft. Das Lösungsmittel verdampfte sofort. Zurück blieb eine dünne Schicht aus polychlorierten Biphenylen, die zum Teil zu tropfenähnlichen Strukturen zusammenliefen (siehe Abb. 3.23).

An der Seite der Träger wurden vorher zwei Löcher von 3.7 mm Durchmesser gebohrt, durch die die PCB-beschichteten Träger senkrecht in einer autoklavierbaren Plastikwanne (27 x 30 cm) am Grund auf einer Lochplatte (ebenso aus autoklavierbarem Plastik) befestigt werden konnten. Die Schale wurde mit 2 L sterilem Leitungswasser gefüllt, das über mehrere Tage mit 200 g PCB-kontaminierten Boden (Kap. 2.3.2) gerührt wurde und aus dem die Besiedlung mit Mikroorganismen erfolgen sollte. Das Wannenvolumen von 4.5 L wurde mit sterilisiertem Leitungswasser aufgefüllt. Die Schale wurde mit einer großen Plastikhaube abgedeckt und bei leichter Durchmischung (30 U min<sup>-1</sup>) bei Raumtemperatur über mehrere Wochen inkubiert.

Das Wachstum des Biofilms konnte mikroskopisch im Hellfeld bei 400-facher Vergrößerung überwacht werden (Zeiss, Axioskop). Um die Veränderung der Zellzahl über die Zeit abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein Teil des Trägers für 5 Min im Dunklen mit einer DAPI-Gebrauchslösung (1 µg ml<sup>-1</sup> PBS-Puffer) überschichtet und vorsichtig mehrfach mit Puffer abgespült. Der Träger wurde auf einem Objektträger mit einem Tropfen Moviol-Einbettungs-Lösung fixiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

##### Moviol-Einbettungs-Lösung

Moviol		2.4 g
Glycin		6.0 g
Tris-HCl (0.2 M, pH 8.5)		12 ml
H <sub>2</sub> O dest.	ad	20 ml

Die gefärbten Zellen konnten mit dem Epifluoreszenzmikroskop (Auxiophot, Zeiss) und dem Filter für den DAPI-Farbstoff (Kap. 2.5) sichtbar gemacht werden. Digitale Fotos wurden mit der an das Mikroskop gekoppelten CCD Kamera (Intras) und der Computer Software Image Pro II aufgenommen. Zur Abschätzung der Zellzahl eines Permanoxträgers wurden die markierte Zellen auf einer Fläche von 12.5 µm x 12.5 µm (156.25 µm<sup>2</sup>) bei 1000-facher

Vergrößerung ausgezählt. Beispiel: nach 4 Monaten Wachstum wurden durchschnittlich 13 Zellen  $\pm$  2 Zellen pro Kleinquadrat gezählt:

10 x 10 Kleinquadrate = 1 Großquadrat mit  $0.156 \text{ mm}^2$  mit  $1.3 \times 10^3$  Zellen

Gesamtfläche A des Permanoxträgers mit  $d = 5.5 \text{ cm}$ :  $A = 23.76 \text{ cm}^2 = 2376 \text{ mm}^2$

$2376 / 0.156 = 1.52 \times 10^5$ ;  $1.3 \times 10^3 \times 1.52 \times 10^5 = 1.98 \times 10^8$

→  $2.0 \pm 0.3 \times 10^8$  Zellen pro Permanoxträgerseite

## 2.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz diente dazu, die Bakterienzusammensetzung im Chemostaten zu bestimmen. Sie bediente sich fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper, die an Oberflächenproteine der Bakterien binden und sie so unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

Alle Lösungen, die für die Immunfluoreszenz benötigt wurden, wurden vor Gebrauch steril filtriert ( $0.2 \text{ }\mu\text{m}$  Porendurchmesser). Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit Hilfe einer Vakuum-Filtrationsanlage durchgeführt (modifiziert nach Dahle und Laake, 1982). Dabei wurden zunächst die Formaldehyd-fixierten bakteriellen Zellen mit spezifischen Antikörpern und deren Konjugaten inkubiert, mit dem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt und anschließend auf einem Polycarbonat-Filter ( $0.2 \text{ }\mu\text{m}$  Porendurchmesser,  $25 \text{ mm}$  Durchmesser, Costar Corporation) immobilisiert. Anschließend wurde der Filter auf einem Objektträger fixiert, eingebettet und konnte bis zur Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop im Dunklen über mehrere Tage bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert werden.

Zunächst wurden 10 bis  $30 \text{ }\mu\text{l}$  der fixierten Bakteriensuspension in dunklen, sterilen Reaktionsgefäßen mit  $600 \text{ }\mu\text{l}$  filtriertem MQ-Wasser und Roti-Block-Lösung (10:1, V:V, Roth) verdünnt und die Antikörpersuspensionen S1 bis S5 hergestellt:

S1  $1.5 \text{ ml H}_2\text{O} + 1.5 \text{ ml 3GB}$  [monoklonaler AK gegen MT1 aus Maus]

S2 - 4 je  $1.0 \text{ ml H}_2\text{O} + 1.0 \text{ }\mu\text{l 201, 202, 107}$  [polyklonaler AK  
gegen MT2, MT3, MT4 aus Kaninchen]

S5  $1.0 \text{ ml H}_2\text{O} + 1.0 \text{ }\mu\text{l 201} + 1.0 \text{ }\mu\text{l 202} + 1.0 \text{ }\mu\text{l 107}$  [alle AK gegen MT2 - 4]

Die Antikörpersuspensionen wurden auf die Proben verteilt, wobei jede Chemostatenprobe vier verschiedene Ansätze hatte. In jedes Gefäß (P1 - 4) wurde zur Bakteriensuspension  $100 \text{ }\mu\text{l}$  S1-Antikörperlösung gegen MT1 gegeben sowie  $200 \text{ }\mu\text{l}$  der Lösung S2 (gegen MT2), S3 (gegen MT3), S4 (gegen MT4) oder S5 (gegen MT2 - 4). Es folgte eine Stunde Inkubation im Tischinkubator (Eppendorf) bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die



alle Antikörper enthielten, musste 100% Deckung zur DAPI-Zellzahl erreichen, um sicherzustellen, dass alle Antikörper binden bzw. keine Kontamination durch andere Bakterien vorliegt. Digitale Fotos wurden mit der an das Mikroskop gekoppelten CCD Kamera (Intras) und der Computer Software Image Pro II aufgenommen.

## 2.6 Extraktion und Analyse-Methoden für Nukleinsäuren

Lösungen und Gegenstände, die zur Extraktion oder weiteren Arbeiten mit Ribonukleinsäuren genutzt werden sollten, wurden entweder RNase-frei bezogen oder mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) zur Inaktivierung aller Enzyme behandelt und anschließend autoklaviert. Chemikalien mit freien Aminogruppen, die durch das DEPC verändert worden wären, wurden mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser angesetzt.

**MQ (DEPC)** (RNase freies Wasser)  
 MilliQ-Wasser 1000 ml  
 DEPC (Diethylpyrocarbonat) 1 ml

DEPC wurde unter einem Abzug zum Wasser gegeben, gut geschüttelt, über Nacht bei halb geöffnetem Deckel gerührt und anschließend autoklaviert.

### 2.6.1 Isolierung der Ribonukleinsäuren aus der Biomasse

Zur Isolation der Ribonukleinsäuren (RNA) wurden ein GTC-Extraktionspuffer nach Chomczynski und Sacchi (1987) genutzt sowie Separationssäulen (RNeasy) und Puffer der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland). Die Separationssäulen von QIAGEN wurden zudem zur Aufreinigung von extrahierten oder enzymatisch veränderten Ribonukleinsäuren verwendet. Zur simultanen Extraktion von RNA und DNA aus PCB-Biofilmen wurde das „FastDNA SpinKit for soil“ von Bio101 genutzt.

#### 2.6.1.1 RNA-Extraktion mit denaturierendem GTC-Extraktionspuffer

**GTC-Denaturierungspuffer** (Chomczynski und Sacchi, 1987)  
 4 M Guanidinisothiocyanat (GTC)  
 25 mM Natriumcitrat 47.12 ml (zusammen pH 7.0, autoklaviert)  
 0,5 % N-Lauryls. (10%) 2.5 ml (steril filtriert)  
 0.1 M beta-Mercaptoethanol 348.8 µl

Das Zellpellet, z.B. aus 2 ml Belebtschlamm, wurde in 200 µl DEPC-behandeltem PBS-Puffer gelöst und in 2 ml fassende, gut verschließbare Reaktionsgefäße (Cryo Tubes, Nunc, Dänemark) mit 0.3 – 0.5 g säuregewaschenen Glaskugeln (80 - 110 µm Durchmesser, Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte durch 30 s Behandlung

im Bead-Beater (B. Braun Biotech, Melsungen). Um einen enzymatischen Abbau der RNA zu verhindern, wurde sofort 600 µl GTC-Denaturierungspuffer und 160 µl Chloroform hinzugegeben und gut geschüttelt. Nach 2 minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 80 µl 2 M Natriumacetat (pH 4.0) und 800 µl Phenol (pH 4.5 – 5.0 für die RNA-Extraktion, Aqua Roti Phenol, Roth) zugefügt, kurz gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 10 000 x g und 4°C. Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol für 10 – 30 min bei Raumtemperatur oder auf Eis gefällt. Die Nukleinsäuren wurden 30 min bei maximaler Umdrehungszahl und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 0.5 ml 70 % Ethanol und 0.2 ml 80 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und kurz im Vacuum getrocknet. Die Nukleinsäuren wurden in 50 bis 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, für 2 min bei 65°C gelöst und sofort wieder auf Eis gestellt oder bei -20°C bzw. – 70°C gelagert.

#### **2.6.1.2 Säulen-Zentrifugations-Aufreinigung der RNA**

Die Extraktionsmethode „RNeasy“ wurde nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Hierzu wurde ein Zellpellet (z.B. aus 2 ml Belebtschlamm) in 200 µl DEPC-behandeltem PBS-Puffer gelöst, mit einer Spatelspitze Lysozym gemischt und die Zellen 10 min bei Raumtemperatur oder bei 37°C inkubiert. Zu den lysierten Zellen wurde 350 µl RLT-Puffer (alle Puffer Bestandteile des Kits, RLT-Puffer enthielt 3.5 µl beta-Mercaptoethanol) gegeben, gut gemischt und 2 min bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 250 µl reinem Ethanol gemischt und anschließend auf die Zentrifugations-Säule gegeben. Die Probe wurde für 15 s mit 10 000 x g zentrifugiert, das Eluat verworfen und nach Zugabe von 700 µl RW1-Puffer (Kitbestandteil) erneut zentrifugiert. Die Säule wurde in einem neuen Reaktionsgefäß zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde in einem weiteren Reaktionsgefäß mit zwei mal 30 bis 50 µl RNase-freiem Wasser, welches direkt auf die Membran pipettiert wurde, in je 1 min bei 10 000 x g eluiert.

#### **2.6.1.3 Simultane RNA- und DNA-Extraktion**

Für die simultane RNA- und DNA-Extraktion mit dem „Fast DNA Spin Kit for soil“ (Bio 101, Vista, CA, USA) wurden die Zellen von 5 bis 10 PCB-Biofilmen in 100 µl PBS-Puffer gelöst, mit 678 µl Natriumphosphat-Puffer, 122 µl MT-Puffer und 300 µl CRSR-Blue-Lösung (Kitbestandteile) gemischt und in ein mit Kugeln gefülltes Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden im FastPrep-Instrument (Bio101, 30 s Einstellung 5.5) aufgeschlossen, für 30 s bei 14 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. 250 µl PPS-Reagenz (Kit) wurden zugegeben, vorsichtig vermischt und für 5 min bei

14 000 x g zentrifugiert. Die Nukleinsäuren im Überstand konnten für 2 min in einem neuen 2 ml-Reaktionsgefäß an 1 ml Binding-Matrix-Suspension binden, die Suspension wurde kurz zentrifugiert, 500 µl abgenommen und die Matrix im verbliebenen Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die nukleinsäurehaltige Matrix auf eine Zentrifugationssäule gegeben und für 1 min bei 14 000 x g zentrifugiert. Die Gesamt-RNA wurde mit 300 µl SEW-M-Puffer (Kit) mit 1 min 14 000 x g eluiert, mit 2,5-fachem Volumen Ethanol (100 %) für mindestens 1 h bei -70°C gefällt, das Pellet wie oben beschrieben mit 80 % Ethanol gewaschen und in 50 – 100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Matrix in der Zentrifugationssäule wird für 2 min bei 14 000 x g getrocknet, auf einem neuen 1.5 ml Reaktionsgefäß mit 50 µl DES-Wasser (Kit) vermischt und die DNA mit 1 min bei 14 000 x g eluiert.

## **2.6.2 Kontrolle und Quantifizierung der Nukleinsäuren**

Die Reinheit und Quantität der isolierten Nukleinsäuren wurde gelelektrophoretisch und photometrisch sowie über einen Fluoreszenzfarbstoff gegen Standardkonzentrationen wie folgt kontrolliert.

### **2.6.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Größen- und Konzentrationsabschätzung der isolierten Nukleinsäuren wurden die Proben auf einem horizontalen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde eine Agarosekonzentration von 1.0 oder 1.5 % (Agarose in 1x TBE- oder TAE-Puffer verwendet. 1 - 2 µl der Probe wurden mit 2 µl Ladepuffer und MQ-Wasser (DEPC) gemischt und in die eine Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte mit TBE als Elektrophoresepuffer und einer konstanten Spannung von 10 V cm<sup>-1</sup>. Nach etwa 1.5 – 2 h wurde das Agarosegel für 15 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 µg ml<sup>-1</sup>) gefärbt und anschließend die gleiche Zeit in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Auswertung der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte mit Hilfe des Enhanced-Analysis-Systems (Herolab, Wiesloch). Als Größenstandard wurden auf jedem Gel 700 ng einer 1 kb-DNA-Leiter (Gibco, Life Technologies, Eggenstein) sowie bei RNA-Gelen ein *Escherichia coli* rRNA-Standard (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) unterschiedlicher Konzentrationen mit 16S- und 23S-rRNA aufgetragen.

**10 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)**

Tris-HCl (1M)	121.1 g	
Borsäure (0.83 M)	51.35 g	
EDTA (10 mM)	3.72 g	
H <sub>2</sub> O (Milli Q)	ad 1000 ml	pH 8.5
(mit Milli Q-Wasser 1:10, v/v verdünnt)		

**50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)**

Tris-Base	242 g	
Essigsäure (99.8 %)	57.1 ml	
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml	
H <sub>2</sub> O (Milli Q)	ad 1000 ml	
(mit Milli Q-Wasser 1:50, v/v verdünnt)		

**5 x Ladepuffer**

Bromphenolblau	25 mg	
Xylencyanol FF	25 mg	
Glycerol	5 ml	
50 x TAE-Puffer	1 ml	
H <sub>2</sub> O (Milli Q)	ad 10 ml	
(mit Milli Q-Wasser 1:5, v/v verdünnt)		

**2.6.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen**

Die Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrollen der isolierten Nukleinsäuren wurden photometrisch (Pharmacia Biotech, GeneQuant II, RNA/DNA-Calculator) durchgeführt. 300 µl der vorverdünnten Nukleinsäure-Probe wurde in eine Quarzglas-Küvette gegeben und die Absorption der Lösung bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm, 230 nm und 320 nm gegen RNase-freies Wasser gemessen. Die Reinheit der Probe konnte durch das Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt werden. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgenden Formeln:

$$c \text{ (RNA) in } \mu\text{g ml}^{-1} = A_{260} \times 40 \quad (1)$$

$$c \text{ (DNA) in } \mu\text{g ml}^{-1} = A_{260} \times 50 \quad (2)$$

c = Konzentration

A = Absorption

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Quantifizierung der RNA erfolgte zusätzlich mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffs Ribogreen (Molecular Probes) im Fluoreszenz-Photometer (FluoroskanII, Titertek, Alabama, USA). In einer Mikrotiterplatte wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit RNA-Standard hergestellt und wie die Probe (1 µl + 29 µl DEPC-Wasser = 3 Parallelen mit je 10 µl verdünnte Probe) mit einer geringen Menge (1 µl in 400 µl DEPC-Wasser) Ribogreen versetzt. Über die Absorptionsmessung der Standard-Verdünnungsreihe konnte eine Kalibriergerade erstellt und so die Konzentration der unbekannten Probe ermittelt werden.



### 2.6.3 Sequenzierung der 23S-ribosomalen Ribonukleinsäure

Zur phylogenetischen Einordnung von Stämmen wird bei prokaryotischen Zellen die Basensequenz der ribosomalen Moleküle (16S-rRNA oder 23S-rRNA) verglichen, die neben stark konservierten Bereichen auch über variable Sequenzbereiche verfügen. Für die Sequenzierung dieser Moleküle wurde die für die RNA codierende DNA-Sequenz über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und nach einer mit fluoreszierenden, degenerierten Basen versetzten Sequenzierungsreaktion die Basenfolge auf einem Polyacrylamidgel abgelesen.

Zur Herstellung eines DNA-Zelllysates wurde von einer Platte eine Einzelkolonie des zu sequenzierenden Stammes gepickt und in 0.1 ml TE-Puffer (pH 8) gelöst und gut vermischt. Die Zellen wurden 10 min bei 94°C im Wasserbad gekocht und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer und große Proteine in einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl für 1 min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren befanden sich im Überstand. Für spätere PCR-Reaktionen wurde das Zelllysate bei –20°C gelagert.

#### TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

Tris HCl	10 mM	
EDTA	1 mM	pH 8.0

#### 2.6.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine automatisierte *in vitro* Methode, die eine gezielte Vermehrung bestimmter DNA-Bereiche des Ausgangsmaterials (Template) durch den Einsatz von Oligonukleotiden als Startmoleküle (Primer) für eine DNA-Polymerase ermöglicht (Saiki *et al.*, 1985).

Für eine PCR-Reaktion sind kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, als Startstellen für die Polymerase nötig, die vor der enzymatischen Reaktion an die einzelsträngige DNA anheften müssen. Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.4 aufgelistet. Die Anlagerungstemperatur wurde nach folgender Formel bestimmt und wurden 2 bis 5°C unter der abgeschätzten Schmelztemperatur  $T_m$  des Oligonukleotids (3) gewählt.

$$T_m = [n(G+C) \times 4^\circ\text{C} + m(A+T) \times 2^\circ\text{C}] \quad (3)$$

Tab. 2.4: Für die Polymerasekettenreaktion des 23S-rRNA-Gens genutzten Primer

Primer	Sequenz 5' – 3'	T <sub>m</sub> -Wert
16F946	CCC GCA CAA GCG GTG GA	58°C
16F1412	CAC ACC GCC CGT CAC ACC	62°C
23F474	CAG TAC CGT GAG GGA AAG G	60°C
23R1042	GCC TTC CCA CWT CGT TT	53°C
23F1075	GTT GGC TTA GAA GCA GC	52°C
23R1929	GAC AAG GAA TTT CGC TAC C	52°C
23F1948	TAG CGA AAT TCC TTG TCG	56°C
23R2744	CTT AGA TGC YTT CAG C	47°C
5R104	GGG CTT GGC GAT GAC CTA C	62°C

**Pipettieransatz für eine PCR (in 0.2 ml-Reaktionsgefäß):**

QIAGEN-Puffer 10x	5 µl	
dNTP-Mix (je 1.25 mM)	5 µl	
Forward-Primer	1.5 µl	(5 pmol Endkonz.)
Reverse-Primer	1.5 µl	(5 pmol Endkonz.)
DNA-Lösung	1 µl	
Taq-Polymerase (5 U µl <sup>-1</sup> )	0.25 µl	
MilliQ-Wasser	ad 50 µl	

Nach Zugabe der Taq-Polymerase wurde der PCR-Ansatz sofort im PCR-Thermocycler (GeneAmp 9600, Perkin Elmer) für 2 min auf 94°C erhitzt und die DNA denaturiert. Das Temperaturprogramm wurde 30 mal wiederholt:

30 s	Primeranlagerung	(je nach Primer 50 – 60°C)
2 min	Polymerasereaktion	(72°C)
30 s	Denaturierung	(94°C)

Nach der letzten Primeranlagerung folgte eine abschließende 5-minütige Auffüllreaktion (72°C) und anschließend hielt der Thermocycler eine Temperatur von 16°C. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch quantitativ und qualitativ überprüft und bei +4°C gelagert.

**2.6.3.2 Sequenzierung des PCR-Produktes**

Vor der Sequenzierung wurde das PCR-Produkt mit dem „QIAquick“-Kit (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt: 50 µl PCR-Produkt wurden mit 250 µl PB-Puffer gemischt, auf Zentrifugiersäulen gegeben und in der Mikrozentrifuge (Eppendorf 5417C) bei 10 000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden mit 700 µl PE-Waschpuffer für 1 min bei 10 000 x g gewaschen, in ein sauberes Reaktionsgefäß gegeben und die Nukleinsäuren in 1 min bei 10 000 x g in 30 µl MilliQ-Wasser eluiert. Die für die Sequenzierreaktion eingesetzten Primer sind in Tab. 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Sequenzierprimer

Primer	Sequenz 5' – 3'	T <sub>m</sub> -Wert
23F114	TCY GAA TGG GGR AAC CC	54°C
23R242	TTC GCT CSC CRC TAC T	51°C
23R559	CAT TMT ACA AAA GGT ACG C	51°C
23F577	GCG TRC CTT TTG TAK AAT G	54°C
23F1623	AAA CCG WCA CAG GTR G	49°C
23R1929	GAC AAG GAA TTT CGC TAC C	56°C
23F2256	TAG TTT RAC TGG GGC GG	53°C
23R2498	GAG CCG ACA TCG AGG	50°C
5R104	GGG CTT GGC GAT GAC CTA C	62°C

**Pipettieransatz für die Sequenzierreaktion** (in 0.2 µl-Reaktionsgefäß)

DNA-Lösung	6 µl
Primer (12 µmol Ausgangskonz.)	1 µl
Sequenzier-Pre-Mix	4 µl
Verdünnungspuffer	4 µl
MilliQ-Wasser	ad 20 µl

Der Sequenzier-Pre-Mix bestand aus Puffer mit der DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs und stammte wie der Verdünnungspuffer von der Firma Amersham als Kit (Amersham DYEnamic ET Terminator cycle sequencing kit).

Die Sequenzier-PCR wurde im Thermocycler (GeneAmp 9600, Perkin Elmer) mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt:

15 s	Denaturierung	(94°C)
15 s	Primeranlagerung	(je nach Primer 47 – 60°C)
90 s	Polymerasereaktion	(60°C)

Von der Reaktionsfolge wurden 30 Zyklen durchlaufen, gefolgt von einer letzten 5-minütigen Auffüllreaktion bei 60°C, bevor die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert wurden. Das Sequenzierprodukt wurde in 80 µl MilliQ-Wasser verdünnt und in einem 0.5 ml-Reaktionsgefäß nach folgendem Protokoll gefällt:

DNA-Lösung	100 µl
Natriumacetat (3 M, pH 4.6)	10 µl
Ethanol (p.a)	250 µl

Die Probe wurde kurz gemischt, 30 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgezogen und das Pellet in 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Es folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehung. Das Pellet wurde ca. 3 min in einem Vakuum-Konzentrator oder bei Raumtemperatur im Dunklen über 1 h getrocknet und bei –20°C gelagert. Alternativ hierzu wurde das Sequenzierprodukt mit Hilfe des "Dye Ex™ Spin Kit" (Qiagen, Hilden) von überschüssigen dNTPs und der Polymerase befreit. Hierzu

wurde das Produkt nach Angaben des Herstellers über eine Gelfiltration aufgereinigt und eluiert. Die gereinigten Produkte wurden im Vakuum getrocknet und anschließend bei -20°C bis zur Sequenzierung gelagert.

Sämtliche Sequenzierungsarbeiten am ABI PRISM™ 337 DNA-Sequencer und am ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser wurden im Bereich Mikrobiologie, GBF durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Verwendung der Programme Sequencher 4.1, GeneWorks, Chromas, GeneDoc, ClustalX, SeqAl. Weitergehende Analysen sowie Sequenzabgleiche wurden mit Programmen aus den aktuellen Versionen der Datenbanken EMBL und GenBank® durchgeführt.

## 2.7 Hybridisierung der Ribonukleinsäuren

Die Hybridisierungen der rRNA wurde mittels Dot-Blot-Hybridisierung, bei der die extrahierte RNA auf einer Nylon-Membran gebunden war, durch Bindung an paramagnetische Partikel und in einer Durchflusshybridisierung mit optischen Biosensoren durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten phylogenetischen Sonden sind in Tab. 2.6 aufgelistet (Amann *et al.*, 1990; Manz *et al.*, 1992).

Tab. 2.6: Phylogenetische Oligonukleotid-Sonden

Sonde	phylogenetische Gruppe	Ziel-Molekül	Sequenz 5'-3'	T <sub>m</sub> -Wert
Gam 42a	Gammaproteobakterien	23S-rRNA	GCC TTC CCA <b>CAT</b> CGT TT	53°C
Bet42a	Betaproteobakterien	23S-rRNA	GCC TTC CCA <b>CTT</b> CGT TT	53°C
Alf 1b	Alfaproteobakterien	16S-rRNA	CGT TCG YTC TGA GCC AG	56°C
Eub 338	Eubakterien	16S-rRNA	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	60°C

### 2.7.1 Dot-Blot-Hybridisierung

Für die Dot-Blot-Hybridisierung wurden Verdünnungen von 1 µg Gesamt-RNA µl<sup>-1</sup> RNase-freiem Wasser hergestellt, mit 16S- und 23S-rRNA von *Escherichia coli* (Roche, Mannheim) als Positiv-Kontrolle in unterschiedlichen Mengen (200, 20 und 2 ng) auf einer positiv geladenen Nylon-Membran (Nucleic acid transfer membranes, Hybond N+, Amersham Life Science, UK) unter Vakuum in einer Dot-Blot-Apparatur (MilliBlot-D, Millipore) aufgetragen, kurz getrocknet und die RNA-Moleküle mit der Membran unter UV-Licht (UV-Stratalinker 1800, Stratagene) quervernetzt. Anschließend folgte die Hybridisierung mit verschiedenen phylogenetischen Sonden (Tab. 2.6).

<b>Hybridisierungspuffer1 (DotBlot):</b>		(Endkonz.)
20x SSC	60 ml	6x SSC
50x Denhardts-Reagenz	20 ml	5x Denhardts-Reagenz
10 % SDS	10 ml	0,5 % SDS
MQ (DEPC)	ad 200 ml	(kurzzeitig bei 4°C gelagert)

**20x SSC**

3 M Natriumchlorid	35 g	
0.3 M Natriumcitrat	17.6 g	
MQ (DEPC)	ad 100 ml	pH 7.0, autoklaviert

**50x Denhardts-Reagenz (Denhardt, 1966)**

PVT (Polyvinylpyrrolidon)	1 g	
Ficoll	1 g	
BSA (Bovin serum albumin)	1 g	
MQ (DEPC)	ad 100 ml	steril filtriert, bei +4°C gelagert

**10 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)**

SDS	10 g	
MQ (DEPC)	ad 100 ml	steril filtriert

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte in einer Glasröhre (30 x 3.5 cm, Appligene) mit 10 ml Hybridisierungspuffer für 2 - 3 h bei 46 – 50°C im Hybridisierungssofen (Mini-Oven, Appligene-Oncor). Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung entfernt und Hybridisierungslösung mit Digoxigenin (DIG)-markierter Oligo-Sonde hinzugegeben (MWG-Biotech AG, Ebersberg; Konz. 25 pmol 5 ml<sup>-1</sup>). Die Sondensequenz für die Stämme MT1 - 4 wurde nach Sequenzierung der 23S-rDNA (komplementär zur 23S-rRNA) für jeden Bakterienstamm spezifisch ausgewählt (siehe Kap. 3.1.1). Die Membran wurde über Nacht mit den Sonden bei 50 – 52°C im Hybridisierungssofen inkubiert.

<b>Natriumchlorid-Waschpuffer</b>		(Endkonz.)
1M Tris-Puffer, pH 8	2 ml	20 mM
10 % SDS	50 µl	0.01 %
5M NaCl	2 ml	200 mmol
	oder 0.5 ml	50 mmol
MQ (DEPC)	ad 50 ml	frisch angesetzt

**1 M Tris**

Tris-Base	121.1 g	
MQ	800 ml	
HCl konz.	42 ml	pH 8.0
MQ	ad 1000 ml	autoklaviert

Zum Entfernen aller ungebundenen Sonden wurde die Membran zweimal 5 min mit 200 mM Natriumchlorid-Waschpuffer und je 15 min bei 50 – 52°C mit 200 mM, 100 mM und 50 mM Natriumchlorid-Waschpuffer im Hybridisierungssofen gewaschen. Um die Stringenz der

Bindung zu erhöhen, wird zum einen die Temperatur im Ofen erhöht oder die Salzkonzentration im Waschpuffer erniedrigt.

Der Nachweis der DIG-markierten Oligo-Sonden wurde nach einem Protokoll von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt.

#### **Puffer 1**

0.1 M Maleinsäure	11.61 g	
0.15 M Natriumchlorid	8.76 g	
MQ (DEPC)	ad 1000 ml	pH 7.5, autoklaviert

#### **Waschpuffer 1**

Puffer 1	1000 ml	
Tween 20	3 ml	(nach Autoklavieren zugeben)

#### **Puffer 2**

Puffer 1	90 ml	
10 % Blocking-Reagenz	10 ml	(kurzzeitig bei +4°C gelagert)

#### **10 % Blocking-Reagenz**

Blocking-Reagenz (Roche)	10 g	
Puffer 1	ad 100 ml	autoklaviert (bei +4°C gelagert)

#### **Detektionspuffer 3**

0.1 M Tris-HCl	15.78 g	(Tris-Base: 12.11 g)
0.1 M Natriumchlorid	5.84 g	
MQ (DEPC)	ad 1000 ml	pH 9.5, autoklaviert

Zunächst wurde die Membran aus der Glasröhre entfernt, 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer 1 gewaschen und für 30 min mit 10 ml Puffer 2 und Blocking-Reagenz mögliche unspezifische Antikörperbindungstellen bei leichter Kippbewegung (Tischkippe WS5 Bühler, J. Otto GmbH, Hechingen) bei Raumtemperatur abgeblockt. Anschließend wurde die Lösung mit einer Pipette abgezogen, und die Membran über 30 min mit 5 ml Puffer 2 (P2) und Blocking-Reagenz zusammen mit DIG-Antikörpern (AK), an die das Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist (10 µl AK-Suspension in 40 ml Puffer 2), bei Kippbewegung bei RT inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und mit 5 ml Waschpuffer 1 die ungebundenen Antikörper 2 x 15 min von der Membran gespült.

Vor der Inkubation mit dem Substrat CSPD (Disodium 2-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decan}-4-phenyl phosphate, Roche) in Detektionspuffer 3 (30 µl 40 ml<sup>-1</sup>) wurde die Membran 5 min in 5 ml Detektionspuffer 3 gelegt. Da CSPD bei Lichteinwirkung zerfällt, wird die Flüssigkeit im Dunklen 10 min bei Raumtemperatur auf der Membran geschwenkt. Anschließend wurde die Membran kurz auf Whatman-Papier

abgetupft und in Polypropylen-Folie eingeschweißt (Clatronic, CTTC, Deutschland). Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wurde 10 min bei 37°C angeregt, bevor die Membran in der Foto-Dunkelkammer auf einen Film (Biomax, Safety Film, Kodak) gelegt wurde. Die Belichtung des Films erfolgte je nach Intensität der Chemolumineszenz über 1 bis 12 h. Zur Entwicklung der Filme wurde die automatische Entwicklungsmaschine (Curix 60, Agfa) genutzt. Die Intensität der so entstandenen geschwärzten Punkte wurde optisch verglichen und so die Qualität der Hybridisierungsreaktion der RNA unterschiedlicher Stämme mit einer Sonde bestimmt.

## 2.7.2 Hybridisierung mit paramagnetischen Partikeln

Zur Separation spezifischer RNA-Moleküle aus dem Nukleinsäuregemisch sollte eine Hybridisierung mit spezifischen Sonden erfolgen, die an paramagnetische Partikel (sogenannte magnetic beads) gekoppelt sind und im magnetischen Feld aus dem Gemisch abgetrennt werden können. Dafür wurden zwei Methoden verglichen, bei denen die Kopplung der Sonden an die Partikel direkt, kovalent oder indirekt über eine Protein-Wechselwirkung bestand. Die magnetische Separation von Nukleinsäuren erfolgte mit paramagnetischen Partikeln der Firma Chemagen, Baesweiler, Deutschland.

### Hybridisierungspuffer 2 (magnetische Separation) (Endkonz.)

20x SSC	12.5 ml	5x SSC
10 % N-Laurylsarcosin	0.5 ml	0.1% N-Laurylsarcosin
10 % SDS	10 ml	0.02 % SDS
5 M Natriumchlorid	171 µl	0.1 % Natriumchlorid
MQ (DEPC)	ad 50 ml	(kurzzeitig bei 4°C gelagert)

### 2.7.2.1 Hybridisierung mit paramagnetischen Partikeln mit kovalenter Bindung zum Oligonukleotid

Zunächst wurden paramagnetische Partikel von der Firma Chemagen (Baesweiler) mit unterschiedlichen Oligonukleotiden kovalent verbunden. 1 mg der Partikel wurden in 0.5 ml Hybridisierungspuffer 2 gewaschen und anschließend in der gleichen Menge Puffer für 15 min bei 46°C prähybridisiert. Für die folgende Hybridisierungsreaktion wurde der Lösung 20 µl (ca. 10 µg) RNA-Lösung zugegeben und 1.5 h bei 46°C im Thermoschüttler inkubiert. Vor den Waschschritten wurde die Probe im Magnetständer (Chemagen, Baesweiler) separiert, so dass ungebundene RNA mit der Hybridisierungs-Lösung abgezogen wurde. Gewaschen wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer (5 min 200 mM Natriumchlorid-Lösung und 5 min vorgewärmte 100 mM Natriumchlorid-Lösung) jeweils vorgewärmt bei 46°C.

Die Abtrennung der RNA-Moleküle von den Partikeln erfolgte durch 5-minütiges Erhitzen der Probe auf 70°C in 30 - 100 µl RNase-freiem Wasser. Um alle Moleküle abzutrennen,

folgte eine zweite Denaturierung bei 75°C in 100 µl RNase-freiem Wasser. Die nukleinsäurehaltigen Lösungen (auch die Wasch- und Hybridisierungs-Lösung) wurden mit 2.5 Vol. Ethanol (p.a., -20°C) und 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.2) gefällt. Nach mindestens 1 h bei -70°C wurden die Nukleinsäuren für 30 min bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut 15 min zentrifugiert, an der Luft getrocknet und in 30 µl RNase freiem Wasser aufgenommen.

### **2.7.2.2 Hybridisierung mit biotinylierten Oligonukleotiden**

Für die Hybridisierung mit biotinylierten Oligonukleotiden, welche mit Streptavidin bedeckten paramagnetischen Partikeln verbunden wurden, wurden 200 µl Hybridisierungspuffer 2 mit 25 % Formamid in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 5 - 10 µg Gesamt-RNA zur Denaturierung für drei min auf 70°C erhitzt. Nach ca. 2 minütiger Abkühlung auf Eis wurden der Probe Biotin-markierte Oligonukleotide zugegeben (50 – 100 pmol). Je nach Probe war die Zugabe von nicht-markierter Gegensonde (z.B. bei den Sonden gegen Beta- und Gammaproteobakterien) notwendig. Die Probe mit den Sonden wurde kurz gemischt und über Nacht auf einem Über-Kopf-Schüttler (Reax2, Heidolph Instruments) bei Raumtemperatur für etwa 20 h inkubiert.

Die mit Streptavidin gekoppelten paramagnetischen Partikel (SAV1 mit einem Durchmesser von 0.5 – 1 µm oder SAV2 mit einem Durchmesser von 1 – 3 µm, Chemagen, Baesweiler) wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, im Magnetständer von der Flüssigkeit separiert und dreimal mit je 200 µl 0.5 x SSC-Lösung gewaschen. Pro Ansatz wurden 0.5 mg Partikel in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit Hilfe von 200 µl Blocking-Lösung für 30 min auf dem Über-Kopf-Schüttler unspezifische Protein-Bindungsstellen blockiert. Danach wurde die Lösung im Magnetständer entfernt und die Hybridisierungslösung mit RNA und Sonden zu den paramagnetischen Partikeln zugegeben. Die Bindung zwischen den Streptavidin- und Biotin-Proteinen erfolgte während der folgenden 2 h bei Raumtemperatur auf dem Über-Kopf-Schüttler. Mit Hilfe des Magnethalters konnte die ungebundene RNA-Lösung von den Partikeln getrennt und mit 1 Vol. (200 µl) Isopropanol für 10 min auf Eis gefällt und durch 30-minütige Zentrifugation bei +4°C und mehrfaches Waschen mit 70 % Ethanol gewonnen werden. Das RNA Pellet wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und zur Überprüfung der Qualität und Quantität gelelektrophoretisch getrennt (Kap. 2.6.2.1).

Die magnetischen Partikel mit der gebundenen rRNA wurden dreimal mit je 200 µl 0.5 x, 0.2 x und 0.1 x PBS-Puffer gewaschen, mit 30 µl RNase-freiem Wasser für 3 min auf 70°C erhitzt und so die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der an den magnetischen Partikel gekoppelten Sonde und dem rRNA-Molekül gelöst. Die wässrige Lösung mit den rRNA-



Molekülen wurde sofort im Magnetständer von den Partikeln getrennt und in ein neues 0.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot dieser Lösung wurde zusammen mit der gesamten RNA der Hybridisierungslösung auf ein 1.5 %-Agarosegel mit TBE-Puffer geladen und die aufgetrennten Nukleinsäuren durch Ethidiumbromid-Einlagerung unter UV sichtbar gemacht (Kap. 2.6.2.1). Die übrige Lösung wurde sofort bei -20°C für die spätere Analyse des Isotopenwertes im Elementaranalysator-Isotopenmassenspektrometer eingefroren.

### 2.7.3 Bindung von rRNA am BIACORE®

Das BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Schweden) ist ein System für biospezifische Interaktionsanalyse (Biospecific Interaction Analysis), in dem eine miniaturisierte Fließinjektionstechnologie mit einem optisch arbeitenden Biosensor kombiniert wurde. Das BIACORE detektiert Masseänderungen auf der Sensoroberfläche mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz. Der austauschbare Sensor Chip (CM5) besteht aus einem Glasträger, der auf einer Seite mit einer dünnen Goldschicht belegt ist. Auf der Glasschicht ist zur Erhöhung der Oberflächenbindungskapazität ein Hydrogel aus carboxymethyliertem Dextran aufgebracht. Moleküle können z.B. über ihre primären Aminogruppen kovalent an der Oberfläche des Chips angekoppelt werden. Ein Bruchteil der Carboxymethyl-Gruppen wird zuvor durch Derivatisierung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS), vermittelt mit 1-Ethyl-3-(Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) aktiviert (Johnsson *et al.*, 1991). Der daraus resultierende NHS-Ester im Hydrogel reagiert mit den primären Aminogruppen des Biomoleküls.

In dieser Arbeit wurde das Protein Streptavidin kovalent an die Chipoberfläche gekoppelt. Alle Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch filtriert (0.2 µm) und im Vakuum entgast. Gesamt wurden 15 µg des Streptavidins (100 µg ml<sup>-1</sup>) über den Chip geleitet, gefolgt von einer Injektion mit Ethanolamin, welches restliche aktivierte Stellen absättigte, damit diese nicht mit dem Analyten reagieren konnten. Zum Abschluss wurde zweimal mit Natronlauge (10 mM) gespült, um etwaige Verunreinigungen und nicht gebundenes Streptavidin zu entfernen. Anschließend erfolgte die Anlagerung von biotinylierten Oligonukleotid-Sonden. Dafür wurden 10 µl der Sonden mit einer Konzentration von 100 pmol µl<sup>-1</sup> mit 90 µl 2x SSC-Puffer (Kap. 2.7.1) vermischt und 60 µl mit einer Fließrate von 5 µl min<sup>-1</sup> über den Chip geleitet. Da der Sensor Chip über vier Reaktionsräume (Flusszellen) verfügt, die einzeln angesteuert werden können, war ein Chip ausreichend, um vier verschiedene Sonden zu binden.

Zur Messung von Anlagerungen auf der Chipoberfläche wurde parallel polarisiertes Licht einer Hochleistungs-LED nahe dem Infrarotbereich auf der der Gold-Dextranschicht abgekehrten Seite gebündelt und das reflektierte Licht durch eine fest angebrachte Anordnung

lichtsensitiver Dioden detektiert. Die Veränderung des Resonanzwinkels kann in Echtzeit verfolgt werden und mit Hilfe von Software Kinetiken berechnet werden. Das BIACORE<sup>®</sup> benutzt Mikrofließzellen mit einem Gesamtvolumen von 60 nl, durch die Proben mit Fließraten von 1-100  $\mu\text{l min}^{-1}$  hindurchfließen können. Die Anlagerungen wurden als erstes mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden, die revers-komplementär zu den gebundenen Oligonukleotid-Sonden aufgebaut waren, in unterschiedlichen Konzentrationen mit 2x SSC getestet (Tab. 3.3). Die Fließrate betrug 5  $\mu\text{l min}^{-1}$ . Die Gesamt-RNA, die an die Sonden binden sollte, wurde entweder mit 2x SSC oder Hybridisierungspuffer 2 (Kap. 2.7.1) mit 8 bis 20  $\mu\text{g pro } 60 \mu\text{l}^{-1}$  verdünnt (Kap. 3.1.3).

Die Immobilisierung wird in sogenannten Sensorgrammen (Darstellung von Signalen gegen die Zeit) aufgenommen. Das aufgenommene Signal ist direkt proportional zur Änderung des Brechungsindex der Oberflächenschicht nahe des Sensors, welche wiederum mit der Massekonzentration bzw. Masseanlagerung korreliert. Die Veränderung auf der Sensorchipoberfläche in Resonanzeinheiten (Resonance Units = RU) werden als Differenz zwischen dem Signal vor Injektion bei Pufferstrom und nach Injektion gemessen, wenn der Laufpuffer wieder über den Sensor fließt. Dabei entsprechen 1000 RU einer Masseanlagerung von 1 ng Protein (Stenberg *et al.*, 1991; Fägerstam *et al.*, 1992).

## **2.8            Reinheitskontrollen der nach der Hybridisierung abgetrennten rRNA**

Um die Reinheit der rRNA nach der Hybridisierung und vor der Isotopenmessung am EA-IRMS sicherzustellen, wurde bei einigen Elutionslösungen neben den in Kap. 2.6.2 aufgeführten Kontrollen eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) sowie Analysen am MALDI-Massenspektrometer (Kap. 2.8.1 und 2.8.2) durchgeführt.

### **2.8.1            Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BIO-RAD Microassay (BIO-RAD Laboratories, 1981) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblue G 250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch Bindung an Proteine (Bradford, 1976). Die Proben (10  $\mu\text{l}$ ) wurden mit 0,2 ml BIO-RAD Protein Assay Farbstoffkonzentrat (BIO-RAD, München) versetzt und 5 - 10 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in Mikrotiterplatten in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer bei 650 nm gegen einen Reagenzienleerwert. Die Proteinkalibrierkurve wurde mit Rinderserumalbumin im Bereich von 0 – 0,5  $\text{mg ml}^{-1}$  aufgenommen.

## **2.8.2 Analyse am MALDI-Massenspektrometer**

Die Massenspektrometrie ist eine Analysemethode zur Bestimmung der Molekülmassen von Biomolekülen im Hochvakuum und wird unter anderem zur Identifizierung von Proteinspots aus 2D-Gelen eingesetzt. Die MALDI-MS (matrix assisted laser desorption ionisation) nutzt aus, dass eine schlecht absorbierende Verbindung bei wesentlich niedrigeren Energiedichten durch Einstrahlung eines Laserpulses ionisiert wird, wenn sie in einem Gemisch mit einer stark absorbierenden Verbindung, der Matrix, vorliegt.

Bei der MALDI-Methode wird die zu analysierende Probe mit einem Überschuss der organischen Matrixsubstanz vermischt, auf einen Probenträger (Target) aufgetragen und mit einem Laser ionisiert. Unter Vakuum werden die Ionen im elektrischen Feld beschleunigt und anhand der Ionenflugzeit (time of flight, TOF) zwischen Quelle und Detektor die Peptidmassen bestimmt. Die Matrix absorbiert den Hauptteil an Energie aus dem Laserpuls und schützt so die Probe vor photolytischer Zersetzung. Sie überträgt die zur Desorption notwendige Energie auf die Probenmoleküle, stellt die für die Ionisierung notwendigen Ladungsträger zur Verfügung, reduziert die Wechselwirkung der Probenmoleküle untereinander sowie mit der Metalloberfläche des Probenträgers und erleichtert dadurch die Desorption. Die Proben wurden in einem Ultraflex™ MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) analysiert. Die massenspektrometrischen Daten aus der MALDI-Analyse wurden mit dem Programm Bruker Data Analysis ausgewertet.

## **2.9 Molekularbiologische Fingerprint-Techniken**

### **2.9.1 Genomische Fingerprintanalyse mittels repetitiver Polymerasekettenreaktion**

Bei der repetitiven Polymerasekettenreaktion („rep“- oder „BOX“-PCR) handelt es sich um einen molekularen Fingerabdruck. Mittels PCR-Amplifikation erfolgt die Bildung spezifischer reproduzierbarer genetischer Fingerprints. Zu den repetitiven Elementen gehört auch das 154 Basenpaar große BOX Element (Versalovic *et al.*, 1994), das für die vorliegende Analyse genutzt wurde. Da die repetitiven Elemente in beiden Orientierungen im bakteriellen Genom vorliegen, genügt ein Primer, der am äußeren Ende der boxA-Untereinheit des BOX-Elements bindet, um distinkte Bereiche genomischer DNA zwischen den BOX-Elementen zu amplifizieren. Vorteil dieser Methode ist die Differenzierung der Bakterien auf Stammebene (Rademaker *et al.*, 1998). Das spezifische Bandenmuster der Reinstämme konnte so den gemischten Bakterienproben (z.B. im Chemostaten) zugeordnet werden bzw. Kontaminationen einer Bakterienkultur eindeutig identifiziert werden.

Primer:        BOXA1R        5'        CTA CGG CAA GGC CGA CGC TGA CG        3'

Eine Spatelspitze Bakterienmasse wurde in 200 µl sterilem MQ-Wasser 10 min bei 96°C gekocht und anschließend die Zelltrümmer über 1 min bei maximaler Umdrehung in der Tischzentrifuge abgetrennt. Die im Überstand befindliche DNA wurde für die PCR eingesetzt.

**BOX-PCR-Ansatz** (Ausgangskonzentration)

DNA-Lösung	1.0 µl
Primer (100 µM)	0.5 µl
dNTPs (5 mM)	6.25 µl
Taq-Puffer (10 x)	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.0 µl
Q-solution (5 x)	5.0 µl
Taq-Polymerase (5 U ml <sup>-1</sup> )	0.2 µl
MQ	ad 25 µl

Nach Zugabe der Taq-Polymerase (wie die Q-solution von der Firma Qiagen, Hilden) wurde der PCR-Ansatz mit einem Tropfen Öl überschichtet, im PCR-Thermocycler (Landgraf, Langenhagen) für 7 min auf 94°C erhitzt. Das folgende Temperaturprogramm lief 30 mal ab:

1 min	Primeranlagerung	(50°C)
8 min	Polymerasereaktion	(65°C)
1 min	Denaturierung	(94°C)

Nach der letzten Primeranlagerung folgte eine 16-minütige Auffüllreaktion (65°C) und anschließend hielt der Thermocycler die Temperatur von 16°C.

Durch die Auftrennung der amplifizierten Fragmente im Agarosegel (3% Agarose in 1x TAE-Puffer über 16 h bei 80 V) entsteht ein genomischer Fingerabdruck. Die unterschiedlich großen DNA-Fragmente wurden über 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg ml<sup>-1</sup>) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

## 2.9.2 „Single-Stranded Conformation Polymorphism“ SSCP

Die Methode „Single-Stranded Conformation Polymorphisms“ (SSCP) ermöglicht die Beschreibung einer mikrobiellen Gemeinschaft auf molekularer Ebene, ihrer Diversität und Einheitlichkeit (Schwieger und Tebbe, 1998). Nach der Amplifizierung eines kurzen DNA-Fragments, welches einen Teil der rRNA kodiert, wird das PCR-Produkt semikonservativ verdaut (siehe unten) und die nun einzelsträngige DNA auf einem Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die nach einer Silberfärbung sichtbaren Banden können durch anschließende Sequenzierung unterschiedlichen Organismen zugeordnet werden (Schmalenberger *et al.*, 2001). Um die aktiven Mikroorganismen einer Gemeinschaft zu

erfassen, wird in dieser Arbeit die Gesamt-RNA extrahiert und die 16S bzw. 23S rRNA in cDNA umgeschrieben, bevor die PCR-Reaktion erfolgt.

Dafür musste nach der RNA-Extraktion zunächst ein DNase-Verdau erfolgen, um Reste extrahierter DNA zu entfernen. Etwa 500 ng Gesamt-RNA wurden in 50 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, mit 5.6 µl 10x DNase-Puffer und 2 µl RNase-freier DNase (beides von Roche) vermischt. Die Proben wurden über 1 h bei 37°C inkubiert und die RNA mit den unter Kap. 2.6.1.2 beschriebenen Zentrifugationssäulen „RNeasy“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die Reverse Transkription der rRNA zu cDNA und die Polymerasekettenreaktion erfolgten in einem Schritt mit Hilfe des OneStep RT-PCR-Kits mit Taq-Puffer, dNTP-Mix und Enzym-Mix von Qiagen (Hilden). Der Reaktionsansatz war wie folgt:

RNA-Lsg.	2 µl	
RNase-freies MQ	30 µl	
Taq-Puffer (5x)	10 µl	
dNTPs-Mix	2 µl	
Primer 1 (12 µM)	2 µl	(siehe unten)
Primer 2 (12 µM, phosphoryliert)	2 µl	(siehe unten)
Enzym-Mix	2 µl	

Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne RNA mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Probe mit 16S- und 23S-rRNA aus *Escherichia coli* (Roche). Zur Überprüfung des vollständigen Verdau der DNA wurde eine Probe erst nach dem Umschreibeprozess (nach den 30 min reverser Transkription) in den Thermocycler gestellt, welche kein Produkt ergeben durfte. Das RT-PCR-Programm im „Eppendorf Mastercycler gradient“ sah wie folgt aus:

30 min	reverse Transkription	(50°C)
15 min	Denaturierung	(95°C)
38 mal:		
40 s	Primeranlagerung	(50°C)
30 s	Polymerasereaktion / Elongation	(72°C)
90 s	Denaturierung	(94°C)

Nach 38 Zyklen folgte eine 10-minütigen Auffüllreaktion bei 72°C, bevor die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei +4°C gelagert wurden. Einer der beiden eingesetzten Primer musste am 5'-Ende phosphoryliert sein.

Primer für die 16S rDNA	(Schwieger und Tebbe, 1998)	Hybridisierungs-Position in <i>E. coli</i>
com 1(F)	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3'	519 - 536
com 2-Ph (R)	5' CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT 3'	907 - 926
(ergeben ein PCR-Produkt von etwa 370 Nukleotiden)		
Primer für die 23S rDNA		
23F577	5' GCG TRC CTT TTG TAK AAT G 3'	577 - 595
23R1059-Ph	5' GGC TGC TTC TAA GCC AAC 3'	1042 - 1059
(ergeben ein PCR-Produkt von etwa 440 Nukleotiden)		

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch überprüft (Kap. 2.6.2.1) und mit dem „Mini-Elute-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 20 µl MQ-Wasser.

Vor dem Auftragen des PCR-Produktes auf das SSCP-Gel musste über einen Exonuclease-Verdau der phosphorylierte Strang des PCR-Produktes entfernt werden. Dafür wurde zu den 20 µl PCR-Produkt 2.5 µl Lambda-Exonuclease-Puffer (10x) und 2.5 µl Lambda-Exonuclease (5 U ml<sup>-1</sup>, NewEngland Biolabs) gegeben und 1 h bei 37°C auf einem Tischschüttler bei mittlerer Umdrehung inkubiert. Die Aufreinigung wurde mit dem „Mini-Elute-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, aber nur mit 10 µl MQ-Wasser eluiert. Die nun einzelsträngige DNA wurde im Vakuum getrocknet und in 4 µl Wasser und 4 µl SSCP-Ladepuffer aufgenommen.

SSCP-Ladepuffer		(Endkonzentration)
Formamid	9.5 ml	95 % v/v Formamid
2 M Natriumhydroxid	50 µl	10 mM Natriumhydroxid
Bromphenolblau	25 mg	0.25 % (w/v) Bromphenolblau
Xylencyanol	25 mg	0.25 % (w/v) Xylencyanol
MQ-Wasser	ad 10 ml	

Vor dem Gießen eines SSCP-Gels mussten die verwendeten Glasplatten gründlich mit Detergenz und anschließend mit 70% Ethanol gereinigt werden. Anschließend wurden die Platten mit einer Lösung aus 5 ml Ethanol, 50 µl Bind-Silane und 50 µl Eisessig beschichtet (10 min Einwirkzeit). Die Heizplatte sowie die beschichtete Glasplatte wird mit 70 % Ethanol gereinigt, 0.4 mm Platzhalter zwischen die Platten gelegt und mit Klammern befestigt.

Zur Herstellung eines kleinen (18 x 18 cm) Acrylamid-Gels wurden

MDE TM-Gel (*)	9 ml	
10x TBE-Puffer	3 ml	
MQ-Wasser	18 ml	zusammen filtriert und entgast.

(\* 2-fach konz. Acrylamid, BMA BioWhittaker Mol. Application, Rockland, USA)

Nach Zugabe von 120 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und 12 µl N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin (TEMED) musste das Gel zügig zwischen die Glasplatten gegossen werden und 2 - 3 h auspolymerisieren. Das Gel wurde in die SSCP-Apparatur (2010-001 Macrophor Electrophoresis Unit, LKB Bromma, Bromma, Schweden) eingespannt, die Kammern mit TBE-Puffer gefüllt und die Apparatur an ein Kühlwassersystem angeschlossen. Die gesamte Probe, die in 8 µl Ladepuffer (1:1) gelöst war, wurde zusammen mit einem Marker in die Taschen geladen. Bei 20°C wurde eine Spannung von 400 V angelegt und über 16 bis 18 h die einzelsträngigen PCR-Produkte im Gel aufgetrennt.

Zur Silberfärbung der Gele (nach Bassam *et al.*, 1991) wurde das Acrylamidgel zunächst für 30 min in 500 ml 10 % Essigsäure fixiert, die anschließend durch dreimaliges Waschen mit Wasser wieder entfernt wurde. Dann folgte das Färben der Gele für 30 min in einer 0.1 % Silbernitrat-Lösung. Diese Färbung wurde durch 20 s im Wasserbad beendet. Das Gel wurde über 2 bis 5 min in die Entwicklungs-Lösung gelegt und der Prozess durch 10 min in der Stopp-Lösung beendet. Zum Imprägnieren wurde das Gel für 10 min in 10 % Glycerol gelegt, mit ebenfalls in Glycerol eingelegter Imprägnierungsfolie luftblasenfrei abgedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

#### **Entwicklungs-Lösung**

Natriumcarbonat	12.5 g
Formaldehyd	500 µl
Natriumthiosulfat (2 %)	500 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

#### **Silbernitrat-Lösung**

AgNO <sub>3</sub>	500 mg
Formaldehyd	500 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

#### **Stopp-Lösung**

2 % Glycin	10 g
0.5 % Natrium-EDTA	2.5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 500 ml

Die Gele wurden in Durchlicht eingescannt, die Bilder als TIFF-Datei gespeichert und mit dem Programm GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) weiter bearbeitet. Hintergrund wurde subtrahiert, die Proben normalisiert und alle Banden über 2 % der Gesamtbanden-intensität analysiert. Mit Hilfe der auf allen Gelen aufgetragenen Marker konnten unterschiedliche Gele verglichen und mittels des ungewichteten Banden-basierenden Cluster Modells von Jaccard Dendrogramme erstellt werden (Legendre und Legendre, 1998). Um die Unterschiede in der genetischen Diversität verschiedener mikrobieller

Gemeinschaften zu beschreiben, wurde der Diversität-Index  $H'$  nach Shannon und Weaver (1969) berechnet, der detailliert von Höfle und Mitarbeitern (1999) beschrieben ist.

Einzelne Banden konnten außerdem zur Identifizierung aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten werden. Sie wurden in 50  $\mu$ l Extraktionspuffer für 15 min bei 95°C denaturiert, kurz bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und 5  $\mu$ l aus dem DNA-haltigen Überstand mit den gleichen Primern, die zuvor genutzt wurden, für eine PCR eingesetzt.

#### **Extraktionspuffer**

10 mM Tris-HCl-Base	157 mg	
5 mM KCl	37 mg	
1.5 mM Mg <sub>2</sub> Cl x 6 H <sub>2</sub> O	30 mg	
0.1 % Triton x 100	1 ml	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 100 ml	pH 9.0

Die PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und mit beiden Primern sequenziert. Die consensus-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Sequencher (Gene Code, Michigan, USA) erstellt. Eine Einordnung der Sequenzen erfolgte mit einem Nblast-Search gegen die unter „<http://ngfnblast.gbf.de>“ frei zugängliche Datenbank.

## **2.10 Analyse von Fettsäuren und Aminosäuren**

Neben den Nukleinsäuren wurden auch andere Biomoleküle wie Fettsäuren und Aminosäuren der mikrobiellen Gemeinschaft extrahiert und analysiert.

### **2.10.1 Lipidanalyse**

#### **2.10.1.1 Extraktion und Trennung der intakten Lipide**

Die Lipide wurden nach einer modifizierten Bligh-Dyer Methode (Bligh und Dyer, 1959) wie von Fredrickson und Mitarbeitern (1986) beschrieben extrahiert. Hierbei wurden 2 g Bakterienmasse in einer Lösung aus 21.1 ml Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.0), 52.6 ml Methanol und 26.3 ml Dichlormethan (0.4:1.0:0.5, v/v/v) resuspendiert und durch eine 15 minütige Ultraschall-Behandlung bei einem Impuls-/Pausenverhältnis von 0.5 W / 0.5 s (Ultraschall Dislocator Labsonic U, B. Braun, USA) aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Wechsel der Lösungsmittelverhältnisse durch die Zugabe von 57.0 ml Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.0), 35.4 ml Methanol und 61.0 ml Dichlormethan (0.9:1.0:1.0, V/V/V) und einer weiteren 5 minütigen Ultraschallbehandlung wurden die Proben zur Phasentrennung bei 5800 x g 15 min zentrifugiert.



Die abgetrennte Dichlormethan-Phase mit den Lipiden wurde über getrocknetes Natriumsulfat und ein hydrophobes Silicon-Filterpapier (Whatman International Limited, Springfield Mill, Maidstone, Kent, UK) abfiltriert. Ein zweiter Extraktionsschritt der wässrigen Methanol-schicht schloss sich durch Zugabe von 25 ml Dichlormethan (DCM), Zentrifugation und Filtration an. Durch die Vereinigung der beiden DCM-Phasen wurde die angereicherte Lipidfraktion (TL) erhalten. Die anschließende Auftrennung der extrahierten TL-Fraktionen erfolgte über eine Silica-Säule (B&J EnviroPrep Silica Column; Baxter Diagnostic Inc., Burdick & Jackson Division, Michigan, USA). Die Säulen wurden bis zur Verwendung bei 100°C aufbewahrt. Nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie mit 10 ml Dichlormethan konditioniert. Die Elution mit jeweils 30 ml der Lösungsmittel Dichlormethan, Aceton und Methanol ergab drei Fraktionen unterschiedlicher Polarität: die neutralen Lipide (NL), die Glyko-(GL) und die Phospholipide (PL). Die Eluate wurden aufgefangen und unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt (Thermoblock mit Ausblaseinheit von Liebig, Bielefeld). Der Rückstand der neutralen Lipidfraktion wurde in 1 ml Dichlormethan, die Glyko- und Phospholipidfraktionen in 1 ml Dichlormethan:Methanol (1:1) aufgenommen.

#### **2.10.1.2 Hydrolyse der Lipide und Methylierung der Fettsäuren**

Die freien Fettsäuren wurden aus den Glyko- und Phospholipiden durch milde basische Hydrolyse über Nacht gewonnen. Hierzu wurden 0.25 ml der in Dichlormethan:Methanol (1:1, v/v) gelösten Glyko- und Phospholipide mit 0.5 ml 1 M Kaliumhydroxidlösung und 2 ml Methanol versetzt. Reaktionsrückstände konnten durch einen Extraktionsschritt mit 2 ml n-Hexan abgetrennt werden. Zu der wässrigen Phase wurden 180 µl 6 M Salzsäure, 1 ml Dichlormethan und 1 ml 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und unter Stickstoffstrom evaporiert. Die Methylierung wurde in 1.5 ml eines Reaktionsgemisches aus Methanol:Dichlormethan:Salzsäure (37 %) (10:1:1, v/v/v) durchgeführt. Anschließend wurden 1 ml Dichlormethan und 1 ml Phosphatpuffer hinzugegeben und nach kräftigem Durchmischen die organische Phase in ein GC-Probengefäß überführt. Die Extraktion wurde mit 0.5 ml Dichlormethan wiederholt und die organischen Phasen vereinigt. Nach Evaporation des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 0.5 ml n-Octan mit internem Standard (n-Hexadecan und n-Tetracosan, ca. 10 ng ml<sup>-1</sup>) aufgenommen.

### **2.10.1.3 Extraktion und Methylierung der gesamten Fettsäuren (MIDI)**

Für die Extraktion und Methylierung der gesamten Fettsäuren nach dem MIDI-System (Sherlock<sup>®</sup> Microbial Identificationsystems, Midi Inc., Newark, Delaware, USA) wurden nur etwa 40 mg feuchte Bakterienbiomasse benötigt, in ein 4 ml Glasgefäß mit dickem Teflonseptum eingewogen und mit 1 ml methanolischer Natriumhydroxidlösung (MeOH:NaOH 15 %; 1:1; v/v) für 1 h bei 100°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml methanolische Salzsäurelösung (MeOH:HCl 37 %; 10:2; v:v) zugegeben und für 10 min auf 80°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 1.5 ml Hexan : tert.-Butylmethyletherlösung (1:1; v/v) und gutes Durchmischen. Nach der Phasentrennung wurde die obere Phase in ein neues 4 ml Glasgefäß überführt. Dieser Arbeitsschritt wurde zweimal durchgeführt. Zu dieser Lösung wurde 3 ml 0.5 M Natriumhydroxidlösung gegeben, wieder gut gemischt und nach der Phasentrennung etwa 2/3 der oberen organischen Phase abgenommen und in ein GC-Probengefäß überführt. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoffstrom eingeengt und die Probe mit den Fettsäuremethylestern in 200 bis 500 µl Octan aufgenommen. Bis zur gaschromatographischen Analyse wurden die Proben bei +6°C oder -20°C gelagert.

### **2.10.1.4 Analyse der Fettsäuren mittels Gaschromatographie**

Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch (Agilent 6890N) mit einer HP Ultra 2 Kapillarsäule (50 m Länge, 0.32 mm Durchmesser, 0.52 µm Filmdicke) analysiert. Bei den Messungen wurde ein Flammenionisations-Detektor (FID) eingesetzt und Wasserstoff diente als Trägergas. Die Injektortemperatur beträgt 250°C, die Detektortemperatur 300°C. Das verwendete Temperaturprogramm sah die folgenden Schritte vor: Die Starttemperatur von 90°C wurde 2 min gehalten, dann wurde mit 4 K min<sup>-1</sup> auf 288°C erhitzt. Es schloss sich eine 10 minütige isotherme Periode an. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über einen Vergleich der Retentionszeiten mit Standardmischungen und zuvor im Labor untersuchten Verbindungen auf der Basis von ECL-Werten (equivalent chain length). Aufgrund einer Konvention entspricht der ECL-Wert der Anzahl der Kohlenstoffatome der entsprechenden unverzweigten, gesättigten Fettsäure. Somit wird beispielsweise die unverzweigte Fettsäure C16:0 mit dem ECL-Wert 16.000 bezeichnet. In Tab. 2.7 werden alle in dieser Arbeit nachgewiesenen Fettsäuren aufgelistet. Zur Kontrolle der Signale wurden GC-MS-Messungen an einem wie oben beschriebenen Gaschromatographen mit Helium als Trägergas durchgeführt, der an ein HP MS-Engine 5989A Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt war.

Tab. 2.7: Fettsäuren, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurden.

Kurzbezeichnung	ECL *	Systematischer Name
gesättigte Fettsäuren		
C12:0	12.000	Dodecansäure
C14:0	14.000	Tetradecansäure
C15:0	15.000	Pentadecansäure
C16:0	16.000	Hexadecansäure
C18:0	18.000	Octadecansäure
C19:0	19.000	Nonadecansäure
ungesättigte Fettsäuren		
C16:1 $\omega$ 7c	15.793	cis-9-Pentadecensäure
C16:1 $\omega$ 7t	15.867	trans-9-Pentadecensäure
C17:1 $\omega$ 6	16.835	12-Heptadecensäure
C17:1 $\omega$ 7ic	16.416	15-Methyl-cis-8-Hexadecensäure
C18:2 $\omega$ 6,9	17.682	6, 9-Octadecadiensäure
C18:1 $\omega$ 9	17.742	9-Octadecensäure
C18:1 $\omega$ 7	17.805	11-Octadecensäure
C20:1 $\omega$ 9	19.743	11-Eicosensäure
verzweigte Fettsäuren		
C15:0i	14.624	13-Methyltetradecansäure
C15:0a	14.707	12-Methyltetradecansäure
C16:0i	15.628	14-Methylpentadecansäure
C17:0i	16.631	15-Methylhexadecansäure
zyklische Fettsäuren		
C17:0 d7,8 cy	16.858	7, 8-cis-Methylenhexadecansäure
C19 :0 d8,9 cy	18.871	8, 9-cis-Methylenoctadecansäure

\*ECL = Äquivalente Kettenlängenwerte (equivalent chain length)

## 2.10.2 Analyse der Aminosäuren

### 2.10.2.1 Saure Hydrolyse der Bakterien und Derivatisierung der Aminosäuren

Eine Spatelspitze (ca. 40 mg) der Feuchtbio­masse des zu untersuchenden Stammes wurde in einem 4 ml-Reaktionsgefäß mit 2 ml 6 M HCl für 24 h bei 100°C hydrolysiert. Zur Entfernung großer Partikel wurde das kalte Hydrolysat sterilfiltriert. Anschließend wurde die verbliebene Salzsäure evaporiert, der Rückstand in 0.4 ml Dichlormethan (DCM) aufgenommen und nochmals unter Stickstoffstrom eingengt, um das restliche Wasser zu entfernen. Die Aminosäuren wurden mit 0.8 ml eines Gemisches aus Isopropanol und Acetylchlorid (5:1, v:v) für 45 min bei 100°C verestert. Anschließend wurde die Probe unter

Stickstoffstrom eingeengt, um das Derivatisierungsmittel zu entfernen. Nach Zugabe von 0.4 ml DCM wurde erneut evaporiert. Die Proben wurden in einem Gemisch aus DCM und Trifluoressigsäureanhydrid (1:1, v/v) aufgenommen und für 15 min auf 100°C erhitzt. Die Abkühlung sowie die folgende Einengung unter Stickstoffstrom erfolgten auf Eis, da die derivatisierten Aminosäuren leicht flüchtig sind. Daher wurde auch nicht ganz bis zur Trockenheit evaporiert, sondern das Derivatisierungsmittel durch zweimalige Zugabe von DCM und anschließende Einengung entfernt. Zuletzt wurde die Probe in 0.1 ml Ethylacetat aufgenommen.

### 2.10.2.2 Gaschromatographie der Aminosäurederivate

Die Zusammensetzung des Aminosäuregemisches wurde gaschromatographisch (HP 5890 Serie II) ermittelt. Dafür wurden eine HP-Ultra II Säule und Wasserstoff als Trägergas eingesetzt. Die Injektionstemperatur betrug 250°C. Bei dem verwendeten Temperaturprogramm zur Auftrennung der leicht flüchtigen Aminosäurederivate wurde die Ausgangstemperatur von 60°C 2 min gehalten, dann stieg die Temperatur um 5 K min<sup>-1</sup> auf 288°C an. Es schloss sich eine zehnminütige isotherme Phase an. Die Analyse der Chromatogramme erfolgte über Vergleiche der Retentionszeiten von Standardmessungen und zuvor analysierter Chromatogramme. Zusätzlich wurde die Aminosäurezusammensetzung der Stämme an einem wie oben (Kap. 2.10.2.1) beschriebenen Gaschromatographen mit Helium als Trägergas durchgeführt, der an ein Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt ist, und die Aminosäuren anhand der in einer Vergleichsbibliothek vorhandenen Spektren identifiziert.

## 2.11 Analytik der polychlorierten Biphenyle (PCB)

Die Substanzklasse der polychlorierten Biphenyle (PCB) besteht aus 209 verschiedenen Komponenten (Kongeneren), die sich im Grad der Chlorierung und der Anordnung der 1 bis maximal 10 Chloratome an den zwei aromatischen Ringen unterscheiden (Abb. 2.2).

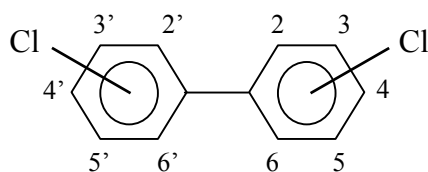


Abb. 2.2: Grundstruktur der polychlorierten Biphenyle mit möglichen Chlorbindungspositionen. Die Kongenere werden anhand der Bindungspositionen der Chloratome unterschieden.

Zur Ermittlung der Konzentration bzw. der Zusammensetzung der verschiedenen Kongenere in den polychlorierten Biphenylen (PCB) des Arochlor 1242-Gemisches (Promochem, Wesel) vor und während einer mikrobiologischen Besiedlung wurde ein Permanox-Träger mit PCB-

Beschichtung halbiert und eine Hälfte (weniger als 2 µl Arochlor 1242) mit Aceton abgespült. Die Aceton-PCB-Mischung wurde in einem Spitzkolben aufgefangen und das Lösungsmittel unter leichtem Stickstoffstrom bei Raumtemperatur bis zur Trockene eingengt. Die verbleibenden polychlorierten Biphenyle wurden in 1.0 bis 1.5 ml Hexan aufgenommen, in ein GC-Glasgefäß überführt und konnten nun direkt in einen Gaschromatographen (HP 5890 Serie II) injiziert werden.

Die Temperatur des Injektors (splitless) betrug 250°C, die des FID-Detectors 300°C. Die PCB-Kongeneren wurden mit einer HP Ultra 2 Säule (5 % Phenyl-Methylsilicon, 50 m x 0.2 mm mit 0.11 µm Filmdicke; Trägergas: Wasserstoff) mit folgendem Temperaturprogramm aufgetrennt: 5 min bei 90°C, anschließend eine Temperaturerhöhung von 4 K min<sup>-1</sup> bis 288°C. Diese Temperatur wurde 10 min gehalten. Die Identifizierung der Signale erfolgte neben den charakteristischen Retentionszeiten auch über das an einen Gaschromatographen gekoppelte Massenspektrometer (HP 5989A Quadrupol). Über die Fläche des Signals konnte zusätzlich die quantitative Verteilung gegen Standardmessungen analysiert und mit Hilfe eines internen Standards (Alkan 16:0 und 24:0) die prozentuale Abnahme der verschiedenen Kongeneren dokumentiert werden. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Agilent Chemstation V8.03 Software.

## 2.12 Isotopenmassenspektrometrie (IRMS)

Mit einem Isotopenmassenspektrometer ist es möglich, die relative Zusammensetzung einer Probe in Bezug auf die Isotope verschiedener Elemente, wie Kohlenstoff (<sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C), Stickstoff (<sup>14</sup>N, <sup>15</sup>N), Sauerstoff (<sup>16</sup>O, <sup>18</sup>O), Schwefel (<sup>34</sup>S, <sup>35</sup>S) oder Wasserstoff (H, D) zu messen. In dieser Arbeit wurde nur das Element Kohlenstoff gemessen, wobei das Verhältnis des schweren Isotops <sup>13</sup>C zum leichteren <sup>12</sup>C im δ<sup>13</sup>C-Isotopenwert in ‰ gegenüber dem Standard PDB ausgedrückt wird (siehe Einleitung Kap. 1.2.1). Die Zufuhr des Kohlenstoffs erfolgte entweder über einen Elementaranalysator, in dem die Probe verbrannt und das CO<sub>2</sub> in das IRMS geleitet wird (EA-IRMS) oder nach Auftrennung der Probe im Gaschromatographen und anschließender Verbrennung zu CO<sub>2</sub> (GC-C-IRMS).

Für die Isotopenanalyse wurde bei allen Versuchen strikt auf die Chargennummern der Kohlenstoffquellen geachtet, da der δ<sup>13</sup>C-Wert einer Chemikalie bei unterschiedlichen Chargen variieren kann. Die mit dem stabilen Isotop <sup>13</sup>C markierten Substanzen wurden von der Firma Cambridge Isotope Laboratories, Andover MA, USA bezogen.

### **2.12.1 Analyse der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Substrate, Biomasse und Nukleinsäuren mit dem Elementaranalysator-IRMS**

Zur Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte von Substraten, der Biomasse und der Nukleinsäuren mit Hilfe des Elementaranalysator-Isotopenmassenspektrometers (EA-IRMS) musste die Probe wasserfrei sein. Etwa 0.5 mg Feuchtbioasse bzw. extrahierte Nukleinsäure wurden in einen Zinntiegel (IVA, Meerbusch) eingewogen, auf einer Heizplatte (Thermoplate „S“, Dasaga) bei 80°C erhitzt, bis das Wasser verdampft war und ein ungefähres Gewicht von 0.1 mg Trockenmasse erreicht war. Anschließend wurde der Zinntiegel mit einer abgeflachten Pinzette verschlossen und konnte im EA-IRMS analysiert werden. Alternativ wurde eine größere Menge Probe in ein Reaktionsgefäß abgewogen und im Lyophilisator (LYSOVAC GT2, Amsco/Finn-Aqua) gefriergetrocknet. Später wurden kleine Teile der getrockneten Probe in Zinntiegel gefüllt und im Elementaranalysator (EA 1008, Fisons, Italien) gemessen. Diese zweite Methode wurde nur zu Beginn der Arbeit angewandt, da die geringe Kohlenstoffmenge, die für den Elementaranalysator nötig war, mit der gefriergetrockneten Biomasse schwieriger zu dosieren war als bei der flüssigen Probe.

Die Probe wurde bei einer Temperatur von 1020°C verbrannt, und die entstehenden Gase durchliefen im Heliumstrom nacheinander eine mit Chromoxid und versilbertem Kobaltoxid gefüllte Oxidationssäule und anschließend bei 650°C eine mit Kupferoxid und Kupfer gepackte Reduktionssäule (Chemikalien von IVA, Meerbusch). Eine Wasserfalle entfernte das restliche Wasser. Danach erfolgte über die gepackte GC-Säule eine Auftrennung der Verbrennungsprodukte  $\text{N}_2$  und  $\text{CO}_2$ . Der Gasstrom wurde über ein ConFlo II-System in das IRMS (Finnigan, Bremen, Serie MAT 252) geleitet. Hier wurden die Moleküle in einem magnetischen Feld ihrer Masse entsprechend abgelenkt und in speziellen „Cups“ (44, 45, 46-Masse) die Menge an leichtem  $^{44}\text{CO}_2$  und schweren  $^{45}\text{CO}_2$  sowie  $^{46}\text{CO}_2$  registriert unter Berücksichtigung des auch vorhandenen schweren Sauerstoffs  $^{17}\text{O}$  im  $\text{CO}_2$ . Als Isotopenstandard diente NBS 22 (Internationalen Atomenergie Behörde, Wien, Österreich) mit einem  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwert von  $29.739 \pm 0.124$  ‰. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Notation ist in der Einleitung (1.2.1) erklärt. Die Datenauswertung erfolgte über die Isodat-Software der Firma Finnigan MAT, Bremen.

### **2.12.2 Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Fettsäuremethylester am Gaschromatographen-IRMS**

Die gaschromatographische Trennung der Fettsäuremethylester erfolgte über eine HP-5 Säule von Hewlett Packard (50 m Länge, 0.32 mm innerer Durchmesser, 0.25 µm Filmdicke) im Trägergas Helium. Das Temperaturprogramm begann mit einer zweiminütigen isothermen Phase bei 125°C, danach stieg die Temperatur mit  $4 \text{ K min}^{-1}$  auf 290°C an. Diese Temperatur

wurde 10 min gehalten. Über das sogenannte „Combustion Interface“ ist die GC-Säule mit dem zuvor beschriebenen Isotopen-Massenspektrometer verbunden (Kap. 2.12.1).

Das Combustion Interface bildet eine Einheit aus Oxidationsofen mit Kupfer, Platin und Nickel, in dem die Substanzen bei einer Temperatur von 980°C zu CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und Stickoxiden verbrannt werden, einem Reduktionsofen aus reinem Kupfer, wo bei 600°C die Stickstoffverbindungen zu N<sub>2</sub> reduziert werden und anschließender Nafion-Membran, an der das entstandene Wasser abgeschieden wird, bevor das Gas über den Heliumstrom in das Massenspektrometer geleitet wird. Des weiteren ist der Gaschromatograph über ein GC-MS-Interface mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (GC-Q, Finnigan Mat, Bremen) verbunden. Zur Kalibrierung des GC-C-IRMS wurde eine C<sub>15</sub>/C<sub>20</sub>/C<sub>25</sub>-Standardmischung der Firma Chiron AS, Trondheim, Norwegen genutzt.

### 2.12.3 Ermittlung der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Fettsäuren mittels Massenbalance

Durch die Methylierung der Fettsäuren wurde ein Kohlenstoffatom zugefügt, das bei der Massenspektrometrie mit erfasst wird ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$ ). Um den  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwert der ursprünglichen Fettsäuren ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ ) zu erhalten, wurde eine Massenbalance (4) zu den einzelnen Fettsäuren erstellt (Abrajano *et al.*, 1994, Goodman und Brenna, 1992). In Tab. 2.8 sind exemplarisch Werte einer Umrechnung aufgeführt.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}} = \frac{(C_{\text{FAME}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}) - (C_{\text{ME}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ME}})}{C_{\text{FA}}} \quad (4)$$

$C_{\text{FAME}}$  : Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäuremethylester

$C_{\text{ME}}$  : Anzahl der Kohlenstoffatome der Methylgruppe

$C_{\text{FA}}$  : Anzahl der Kohlenstoffatome der Fettsäure

Tab. 2.8: Ermittlung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte von Fettsäuren

Fettsäure (Trivialnamen)	$C_{\text{FA}}$	$C_{\text{ME}}$	$C_{\text{FAME}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{ME}} [\text{‰}]$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} [\text{‰}]$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}} [\text{‰}]$
C14:0 (Myristinsäure)	14	1	15	-37.57	-30.61	-30.11
C16:1 (Palmitoleinsäure)	16	1	17	-37.57	-35.14	-34.98
C16:0 (Palmitinsäure)	16	1	17	-37.57	-34.12	-33.90
C18:1 (Ölsäure)	18	1	19	-37.57	-36.62	-36.57
C18:0 (Stearinsäure)	18	1	19	-37.57	-34.20	-34.01

### 2.12.4 Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Aminosäurederivate

Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der einzelnen Aminosäurederivate konnten mit dem Isotopen-Massenspektrometer ermittelt werden. Das Temperaturprogramm des Gaschromatographen entsprach dem in Kap. 2.9.2.2 beschriebenen Temperaturprogramm für Aminosäurederivate. Der apparative Aufbau des GC-C-IRMS ist in Kap. 2.11.2 erklärt.

Durch die Derivatisierung der Aminosäuren mit Isopropanol und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) wurden, wie Abb. 2.3 verdeutlicht, zusätzliche Kohlenstoff-Atome eingebracht, die den Isotopenwert der Aminosäure verändern.

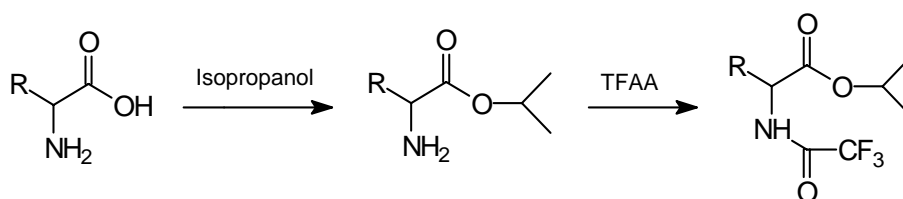


Abb. 2.3: Derivatisierung der Aminosäuren mit Isopropanol und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA)

Daher musste mittels einer Massenbalance über bekannte  $^{13}\text{C}$ -Standardwerte der  $^{13}\text{C}$ -Wert der durch die Derivatisierung hinzugekommenen Kohlenstoffatome errechnet werden (5). Standards der underivatisierten Aminosäuren (Sigma Chemical Co., USA) wurden mit dem oben beschriebenen Elementaranalysator gemessen, der an das IRMS gekoppelt ist ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{AA}}$ ). Zusätzlich wurden diese Aminosäuren in Standardgemischen derivatisiert und am GC-C-IRMS deren Isotopenwerte ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{derivatAA}}$ ) ermittelt. Mit Hilfe der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der derivatisierten ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{derivatAA}}$ ) und underivatisierten Aminosäuren ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{AA}}$ ) konnte ein  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der zugefügten Kohlenstoffatome durch das Derivatisierungsmittel mit folgender Massenbalance (5) ermittelt werden (Silfer *et al.*, 1994):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ISO+TFAA}} = \frac{[\delta^{13}\text{C}_{\text{derivAA}} \cdot x(C_{\text{AA}} + aC_{\text{ISO}} + bC_{\text{TFAA}}) - (\delta^{13}\text{C}_{\text{AA}} \cdot xC_{\text{AA}})]}{(C_{\text{ISO}} + C_{\text{TFAA}})} \quad (5)$$

$C_{\text{AA}}$ :	Anzahl der Kohlenstoffatome der Aminosäure
$C_{\text{ISO}}$ :	Anzahl der Kohlenstoffatome von Isopropanol
$C_{\text{TFAA}}$ :	Anzahl der Kohlenstoffatome von TFAA
a:	Anzahl der Isopropyl-Moleküle
b:	Anzahl der TFAA-Moleküle
$\delta^{13}\text{C}_{\text{ISO+TFAA}}$ :	$\delta^{13}\text{C}$ -Wert der eingefügten C-Atome

Anschließend konnte der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der underivatisierten authentischen Aminosäuren, ebenfalls über eine Massenbalance (6) zurückgerechnet werden:



$$\delta^{13}C_{AA} = \frac{[\delta^{13}C_{derivAA} x(C_{AA} + aC_{ISO} + bC_{TFAA})] - [\delta^{13}C_{ISO+TFAA} x(aC_{ISO} + bC_{TFAA})]}{C_{AA}} \quad (6)$$

Zusammenfassend werden die Werte, die für die Umrechnung der  $\delta^{13}C$ -Werte der ursprünglichen Aminosäuren nötig sind, in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9: Ermittlung des  $\delta^{13}C$ -Wertes der durch das Derivatisierungsmittel hinzugefügten Kohlenstoff-Atome

Aminosäure	$C_{AA}$	$\delta^{13}C_{AA}$ [‰]	$C_{ISO}$	$C_{TFA}$	$\delta^{13}C_{derivatAA}$ [‰]	$\delta^{13}C_{ISO+TFA}$ [‰]
Alanin	3	-23.3	3	2	-30.0	-34.0
Glycin	2	-37.7	3	2	-34.4	-33.1
Threonin	4	-28.5	3	2	-32.1	-35.0
Serin	3	-37.7	3	2	-36.1	-35.2
Valin	5	-16.2	3	2	-25.8	-35.4
Leucin	6	-29.7	3	2	-30.7	-32.0
Isoleucin	6	-11.5	3	2	-22.9	-36.6
Prolin	5	-12.0	3	2	-21.7	-31.4
Asparaginsäure	4	-28.0	6	2	-30.0	-31.0
Glutaminsäure	5	-26.9	6	2	-28.2	-29.0
Phenylalanin	9	-11.9	3	2	-19.8	-34.1
Lysin	6	-21.7	3	4	-28.1	-33.6

### 2.12.5 Berechnung der Isotopenfraktionierung

Eine Isotopendifferenz zwischen zwei Verbindungen kann für jedes Experiment mit einem Fraktionierungsfaktor  $\varepsilon$  beschrieben werden, wobei  $\varepsilon$  nach den folgenden Formeln (7) errechnet wird. Der Fraktionierungs- oder Anreicherungsfaktor wird normalerweise für natürliche Isotopenwerte von „Ausgangsverbindung“ (Reactant:  $\delta^{13}C_A$ ) und Produkt ( $\delta^{13}C_B$ ) einer enzymatischen Umsetzung gewählt (Hayes, 1993) und wurde in dieser Arbeit auf die Markierungsdifferenz in Biomasse ( $\delta^{13}C_A$ ) und RNA ( $\delta^{13}C_B$ ) angewendet.

$$\varepsilon = 10^3 (\alpha - 1); \quad \alpha = [(\delta^{13}C_A + 1000) / (\delta^{13}C_B + 1000)] \quad (7)$$

### 3 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur Ermittlung des Detail-Kohlenstoffflusses in mikrobiellen Gemeinschaften entwickelt werden. Dafür wurden Mikroorganismen Substrate zugegeben, welche mit dem stabilen Isotop  $^{13}\text{C}$  markiert waren, und der Isotopenwert von ausgewählten Biomarker-Molekülen bestimmt, die Rückschlüsse auf die Organismen zulassen. Die Möglichkeiten sowie die Bestimmungsgrenzen dieser Methode wurden zunächst anhand von Reinkulturen in Batch-Kulturen, danach in einer mikrobiellen Gemeinschaft an einem einfachen, geschlossenen System im Chemostat getestet. Anschließend wurde die Isotopenmarkierung in komplexen biologischen Systemen, in Biofilmen auf polychlorierten Biphenylen und in Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage angewendet.

Das in dieser Arbeit untersuchte definierte mikrobielle Konsortium bestand aus vier Stämmen, *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, *Achromobacter* sp. MT3 und *Empedobacter* sp. MT2. Diese Bakterien wuchsen in kontinuierlicher Kultur mit 4-Chlorsalicylat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, einem Schlüsselmetabolit des aeroben Abbaus von halogenierten Dibenzofuranen (Arfmann *et al.*, 1997). Da nur *Pseudomonas* sp. MT1 4-Cl-Salicylat als Kohlenstoff-Quelle nutzen kann (Pelz *et al.*, 1999), war über MT1 der Substratfluss zu den anderen Stämmen erforderlich. Eine geringe Menge der Verbindung 4-Cl-Catechol, welche durch oxidative Decarboxylierung aus 4-Cl-Salicylat gebildet wird (Dorn und Knackmuss, 1978; Reineke, 1984), wurde vollständig  $^{13}\text{C}$ -markiert zu der mikrobiellen Gemeinschaft in den Chemostaten gegeben und der Einbau des stabilen Isotops in die Zellen und in verschiedene Biomarker-Moleküle wie die rRNA und Fettsäuren untersucht (Kap. 2.12).

Für die Isotopenanalysen von Biomarker-Molekülen am EA-IRMS ist die Menge an Kohlenstoff ein limitierender Faktor (MacGregor *et al.*, 2002). Daher wurde neben Ermittlungen der Detektionsgrenzen (Kap. 3.2) eine Methode optimiert, die bei den Ribonukleinsäuren die 23S-rRNA, welche mit etwa 2900 Nukleotiden nahezu doppelt so groß ist wie die 16S-rRNA, mittels einer Hybridisierung separiert. Nach der Sequenzanalyse des 23S-rDNA-Gens wurden Oligonukleotid-Sonden entwickelt (Kap. 3.1) und zusammen mit phylogenetischen Sonden gegen Gamma- und Betaproteobakterien zur Separation von  $^{13}\text{C}$ -markierter rRNA eingesetzt, zunächst in definierten RNA-Mischungen (Kap. 3.3), anschließend in der Gesamt-RNA des mikrobiellen Konsortiums (Kap. 3.5). Neben der rRNA wurde die Isotopenaufnahme in weiteren Biomolekülen verfolgt und die Isotopenfraktionierungen in der Synthese dieser Moleküle ermittelt (Kap. 3.4).

### 3.1 Entwicklung Stamm-spezifischer Oligonukleotid-Sonden und Optimierung der Hybridisierung

Zur Entwicklung stamm-spezifischer Oligonukleotid-Sonden wurde das 23S-rDNA Gen aller vier im Chemostaten vorkommenden Stämme sequenziert (siehe Anhang). Die generierten Sonden wurden zusammen mit bekannten phylogenetischen Sonden Gam 42a und Bet 42a gegen Gamma- und Betaproteobakterien (Manz *et al.*, 1992), welche ebenfalls an das 23S-rRNA Molekül binden, auf ihre Effizienz in verschiedenen Hybridisierungen getestet.

#### 3.1.1 Vergleich der 23S-rDNA-Sequenzen und Sonden-Entwicklung

Die Sequenzen der 23S-rDNA der vier im Chemostaten vertretenen Stämme wurden über ein manuelles Alignment miteinander verglichen. Die hoch variablen Sequenzbereiche wurden als Hybridisierungs-Bereich für die neu entwickelten Oligonukleotide zur Differenzierung zwischen den Konsortienstämmen gewählt. Besonders schwierig war dies für die Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, da diese eine Ähnlichkeit von 98.9 % zueinander aufwiesen. Weiterhin wurde auf möglichst geringe Selbstbindung und Schleifenbildung der Oligonukleotide geachtet. Die Positionen der Oligonukleotide auf dem 23S-rRNA-Molekül sowie ihre Sequenzen sind in Abb. 3.1 und Tab. 3.1 dargestellt.



Abb. 3.1: Positionen von spezifischen Oligonukleotid-Sonden der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, *Empedobacter* sp. MT2 und *Achromobacter* sp. MT3 auf dem 23S-rRNA-Molekül, welche in Dot-Blot-Hybridisierungen getestet wurden.

Tab. 3.1: Sequenzen und Position der Oligonukleotid-Sonden innerhalb der 23S-rRNA der Stämme MT1 bis MT4 für die Dot-Blot-Hybridisierungen. \* Basendifferenz = minimale Anzahl der Basenunterschiede zum nächsten Stamm.

Oligo-nukleotid	Sequenz (5' - 3')	Position in 23S-rRNA ( <i>E.coli</i> )	T <sub>m</sub> [°C]	Basen-differenz*
MT1A	CAG TCA CTG TTA CCT AAC C	704-721	55	2
MT1B	GCA TCA ACC ACT TCG TGT TC	1533-1552	57	3
MT4A	GCA TCA ACC AGT TCG TCA TC	1533-1552	57	3
MT3A	CAC TGT ACG ACG GTA CTG G	1420-1439	58	9
MT3B	CCG ATT CTC TGC GAC CCC A	1750-1767	61	8
MT2A	GCA CTT CTC GCT ATT TCT T	1570-1587	42	7
MT2B	CCC CGC ATC CAA TCA GTA G	867-884	58	7
Gam 42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	1027-1043	50	1
Bet 42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	1027-1043	49	1

Die generierten Sonden wurden mittels Dot-Blot-Hybridisierung (Kap. 2.7.1) auf ihre Bindung an das 23S-rRNA-Molekül der im Chemostaten vorkommenden Stämme getestet. Durch visuellen Vergleich der Menge an gebundenem Oligonukleotid auf die an der Membran gebundenen Gesamt-RNA der vier Stämme sowie ihrer Spezifität wurden die Sonden MT1B, MT2B, MT3A und MT4A ausgewählt. Im direkten Vergleich zu den Sonden Gam 42a bei der rRNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4 und der Sonde Bet 42a bei der rRNA des Stammes *Achromobacter* sp. MT3 zeigten die stammspezifischen Sonden in der Dot-Blot-Hybridisierung geringere Bindungsstärken.

In den folgenden Hybridisierungsexperimenten mit paramagnetischen Partikeln (Kap. 2.7.2 und 2.7.3) wurden mit den in Tab. 3.1 aufgeführten Sonden gegenüber der Gam 42a- und Bet 42a-Sonden geringere Mengen an 23S-rRNA gebunden und separiert (Kap. 3.1.2). Zur Generierung neuer Oligonukleotid-Sonden wurde das Programm ARB ([www.arb-home.de](http://www.arb-home.de), TU-München) verwendet, welches eine Funktion zur Generierung spezifischer Oligonukleotid-Sonden besitzt. Diese Oligonukleotide sind in Abb. 3.2 und in Tab. 3.2 aufgeführt.

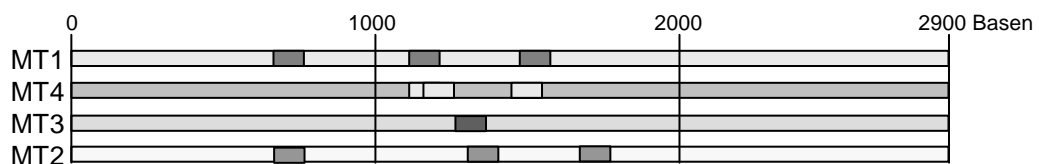


Abb. 3.2: Positionen von spezifischen Oligonukleotid-Sonden der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, *Empedobacter* sp. MT2 und *Achromobacter* sp. MT3 auf dem 23S-rRNA-Molekül für Hybridisierungsexperimente mit paramagnetischen Partikeln.

Tab. 3.2: Sequenzen und Positionen der Oligonukleotid-Sonden innerhalb der 23S-rRNA für die Stämme MT1 bis MT4 für Hybridisierungen mit paramagnetischen Partikeln. \* Basendifferenz = minimale Anzahl der Basenunterschiede zum nächsten Stamm

Oligo-nukleotid	Sonden-Sequenz (5' - 3')	Position in 23S-rRNA ( <i>E.coli</i> )	T <sub>m</sub> [°C]	Basen-differenz*
MT1-716	CTC CAG TCA GTG TTA CCT	716-733	54	2
MT1-1522	GAA CAC TCG TCA TCA GCT	1522-1539	54	3
MT1-1165	CAC <b>CTA</b> <b>AGT</b> GAT ACC CGT	1165-1182	54	2
MT4-1165	CAC <b>TTA</b> <b>CGT</b> GAT ACC CGT	1165-1182	54	2
MT4-1173	TAC CGC ATC ACT TAC GTG	1173-1190	54	2
MT4-1475	GAT TCC AGC CTA CCA CCT	1475-1492	56	1
MT3-1289	TAC GGC GAG GGG GCT TTT	1289-1306	58	4
MT2-1705	TTG CTG TCA GCG ACC TTT	1705-1722	54	8
MT2-1358	CCC GTT AGG GTT CGT GTT	1358-1375	56	5
MT2-720	GGT CCT CCA CTT TGT GTT	720-737	54	2

### **3.1.2 Hybridisierung und Separation von 23S-rRNA-Molekülen mit paramagnetischen Partikeln**

Für die Hybridisierung und Abtrennung der 23S-rRNA-Moleküle aus einem RNA-Gemisch wurden zwei unterschiedliche Methoden gewählt. Zunächst wurde die Separation der Moleküle nach Kopplung der hybridisierten Sonden an paramagnetische Partikel im magnetischen Feld durchgeführt (Kap. 2.7.2 und Kap. 2.7.3). Weiterhin wurden die Sonden auf einer Chipoberfläche (BIACORE®) immobilisiert und die Hybridisierung der rRNA im Durchflussverfahren durchgeführt (Kap. 2.7.4 und Kap. 3.1.3).

Beim ersten Verfahren waren die Oligonukleotide an paramagnetische Partikel (magnetic beads) gebunden, so dass nach einer Hybridisierung mit dem 23S-rRNA-Molekül die Separation im magnetischen Feld möglich war. Zunächst wurde die Hybridisierung der rRNA mit kovalent an die magnetischen Partikel gekoppelten Sonden MT1B und MT3A (Tab. 3.1) durchgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung der separierten rRNA zeigten erst unspezifische Bindungen. Nach Erhöhung der Stringenz durch ansteigende Formamidkonzentrationen sowie erhöhte Temperaturen bei der Hybridisierung und beim anschließenden Waschen (Kap. 2.7.2) konnte spezifisch die 23S-rRNA bis zu einer Menge von 50 ng separiert werden (Abb. 3.3, Spur 6 und 7).

Ein Vorteil der direkten Kopplung zwischen Oligonukleotid-Sonde und paramagnetischen Partikeln war, dass keine weiteren Proteine während der Hybridisierung beteiligt waren, welche sich negativ auf die spätere Isotopenmessung hätten auswirken können. 50 ng rRNA reichten jedoch für eine Messung am EA-IRMS nicht aus (Kap. 3.2), so dass zur Erhöhung der Menge an 23S-rRNA, auf die von Bach und Mitarbeitern beschriebene (1999) indirekte Kopplung zwischen Sonde und paramagnetischen Partikeln zurückgegriffen wurde (Kap. 2.7.2.2). In einem Vergleich mit identischen Sonden, aber unterschiedlichen Partikeln, wurde zudem die Möglichkeit zur erneuten Verwendung der Partikel nach einer Hybridisierung untersucht (Abb. 3.3).

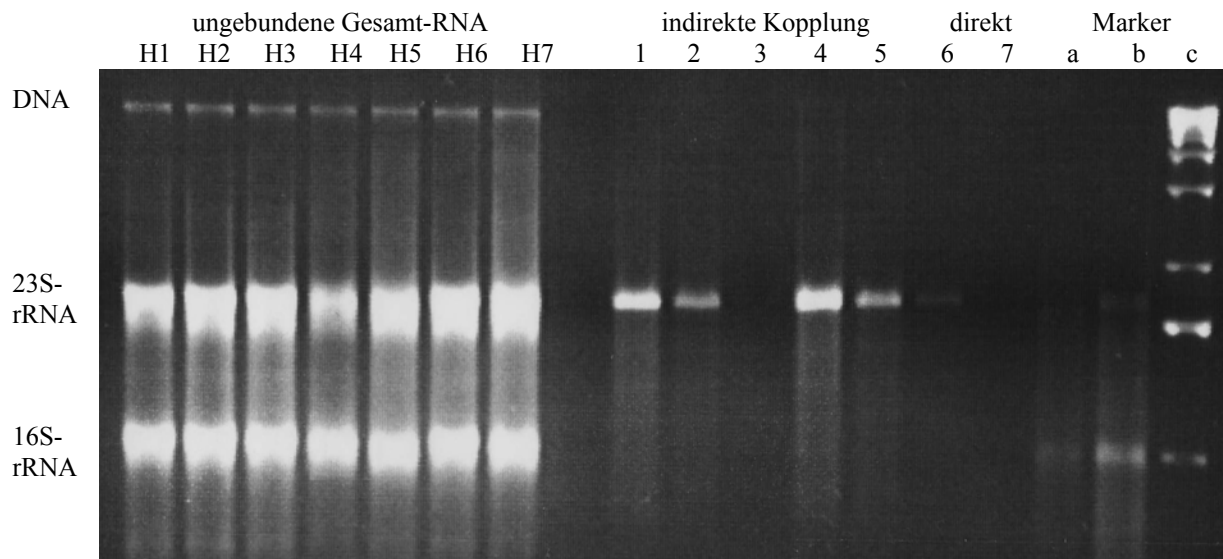


Abb. 3.3: Vergleich verschiedener Sonden und paramagnetischer Partikel zur Separation von 23S-rRNA aus Gesamt-RNA des Stammes *Pseudomonas* sp. MT1 nach Auftrennung im 1.5%-igen Agarosegel. H1 - H7: ungebundene RNA aus der Hybridisierungslösung der Proben 1 – 7; 1 - 3 SAV1-Beads mit biotinylierter Gam 42a-Sonde (wiederverwendet): 1: bei +4°C gelagert; 2: bei Raumtemperatur gelagert; 3: mit zusätzlicher biotinylierter Sonde; 4 - 5 SAV-Beads mit biotinylierter Gam 42a-Sonde: 4: SAV1 (d = 0.7 µm); 5: SAV2 (d = 1.8 µm); 6 - 7 direkte Kopplung Sonde-Bead (SAV2): 6: Gam 42a; 7: MT1B; a - c Marker: a: *E.coli* 50 ng 16S- und 23S-rRNA (Roche); b: *E.coli* 100 ng; c: 1kb-Leiter (Gibco)

Die für die Hybridisierung eingesetzte Gesamt-RNA enthielt, neben den auf dem in Abb. 3.3 gezeigten Agarosegel nicht sichtbare tRNA, mRNA und 5S rRNA, hauptsächlich 16S-rRNA und 23S-rRNA sowie Spuren von DNA (Kap. 2.6.1.1). Die spezifische Separation der 23S-rRNA mittels paramagnetischer Partikel war bei vier der sieben Ansätze erfolgreich. Der visuelle Vergleich der gefärbten 23S-rRNA-Banden nach Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden und anschließender Anheftung an SAV1-Beads (Abb. 3.3, Ansatz 4) mittels zuvor für eine Hybridisierung genutzter SAV1-Beads (Abb. 3.3, Ansatz 1 bis 3) mit gekoppelten Sonden zeigte, dass die zweifach genutzten SAV1-Beads nur eine geringfügig schlechtere Bindungseffizienz aufwiesen, solange sie bei 4°C gelagert wurden und nicht erneut biotinylierte Sonde zugegeben wurde.

Die kleineren Beads SAV1 (d = 0.7 µm) (Abb. 3.3, Ansatz 5) hatten gegenüber den größeren Beads SAV2 (d = 1.8 µm) (Abb. 3.3, Ansatz 4) eine bessere Bindungseffizienz. Bei der Hybridisierung über direkt gekoppelte Sonden konnte weniger RNA gebunden werden (Abb. 3.3, Ansatz 6) als über die biotinylierten Sonden (Abb. 3.3, Ansatz 5). Zudem war ein Unterschied im Bindungsverhalten der verschiedenen Sonden sichtbar. Die Gam 42a-Sonde für Gammaproteobakterien (Abb. 3.3, Ansatz 6) erreichte bei diesen Hybridisierungsbedingungen eine bessere Bindung an die RNA von *Pseudomonas* sp. MT1 als die MT1B-Sonde (Abb. 3.3, Ansatz 7). In weiteren Hybridisierungen zeigten die in Tab. 3.2 generierten Sonden gegenüber der Gam 42a- und Bet 42a-Sonde ebenso geringe Bindungseffizienz.

Aus diesen Vorversuchen ging hervor, dass die Verwendung von biotinylierter Gam 42a Sonde für die rRNA von *Pseudomonas* sp. MT1 und Bet 42a-Sonde für *Achromobacter* sp. MT3 und anschließende Separation mit den kleineren Streptavidin-gekoppelten Partikeln (SAV1) für die folgenden Versuche am erfolgversprechendsten waren.

### 3.1.3 Hybridisierung im Zellendurchflussverfahren am BIACORE®

Parallel zu den Experimenten mit paramagnetischen Partikeln (Kap. 3.1.2) wurde der optische Affinitätssensor BIACORE® (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Schweden) auf seine rRNA-Bindungs- und Separationsmöglichkeiten getestet. Bei dem BIACORE®-System handelt es sich um einen Sensor, mit dem Veränderungen auf der Chipoberfläche in Echtzeit verfolgt werden können. So wurden z.B. Bindungen von Antikörpern (Zeder-Lutz *et al.*, 1993), die Wechselwirkungen von Oligonukleotiden (Kuhlmeier, 2000; Davis, 1994) untersucht oder auch Antibiotika wie Sulfamethazine (Akkoyun, 2002) nachgewiesen. Die Detektion erfolgt markierungsfrei.

In dieser Arbeit wurde das Protein Streptavidin kovalent an die Oberfläche des CM5-Sensor-Chips von Pharmacia Biosensor gekoppelt (Kap. 2.7.4). Anschließend erfolgte die Anlagerung von biotinylierten Oligonukleotid-Sonden (pro Fließzelle 1 nM MT1B-, MT3A-, Gam 42a- und Bet 42a-Sonde). Da der Sensor Chip über vier Fließzellen verfügte, die einzeln angesteuert werden können, war ein Chip ausreichend, um alle Sonden zu binden.

Zunächst wurde die Bindung der biotinylierten Sonden an die Chipoberfläche mit Digoxigenin-markierten Komplementär-Sonden, welche revers und komplementär zu den gebundenen Sonden MT1B und MT3A waren, kontrolliert und deren Immobilisierung in sogenannten Sensorgrammen (Darstellung von Signalen gegen die Zeit, siehe Abb. 3.4) aufgenommen. Das aufgenommene Signal (Resonance Unit =  $\Delta$ RU) ist direkt proportional zur Änderung des Brechungsindex der Lösung an der Oberfläche des Sensors, welche wiederum mit der Masseanlagerung korreliert ist. Die Anlagerung von 0.01, 0.1 und 1 pmol der Sonden MT1B-K und MT3A-K wurde gemessen, wobei durch 1 pmol der digoxigenierten Komplementär-Sonden ein Signal von 1257 und 1055 RU erreicht wurde, was 1.2 und 1.0 ng Anlagerung in einer Fließzelle entsprach (Tab. 3.3). Gleichzeitig wurden 0.03 und 0.22 ng der Komplementär-Sonde unspezifisch in der zweiten Fließzelle gebunden (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Anlagerung von Digoxigenin-markierten Gegensonden in verschiedenen Konzentrationen an die in Fließzelle 1 und 2 gebundenen Sonden MT1B und MT3A im BIACORE®. Die Signaländerung ( $\Delta RU_2$  Resonance Units) entspricht einer Anlagerung in pg.

Fließzelle mit Sonde	$\Delta RU_2$ nach Anlagerung der Komplementär-Sonde MT1B-K			$\Delta RU_2$ nach Anlagerung der Komplementär-Sonde MT3A-K		
	0.01 pmol	0.1 pmol	1.0 pmol	0.01 pmol	0.1 pmol	1.0 pmol
MT1B	136	894	1257	135	89	217
MT3A	5	21	29	169	145	1055

Anschließend wurden Experimente zur Bindung der 23S-rRNA aus einem RNA-Gemisch an die Oligonukleotide auf der Chip-Oberfläche durchgeführt. Für die Hybridisierung im Zelldurchflussverfahren wurden 8  $\mu$ g Gesamt-RNA, die aus den Stämmen *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 isoliert wurden (Kap. 2.6.1.2), und 20  $\mu$ g 16S- und 23S-rRNA von *Escherichia coli* (Roche) eingesetzt (Abb. 3.4 und Tab. 3.4).

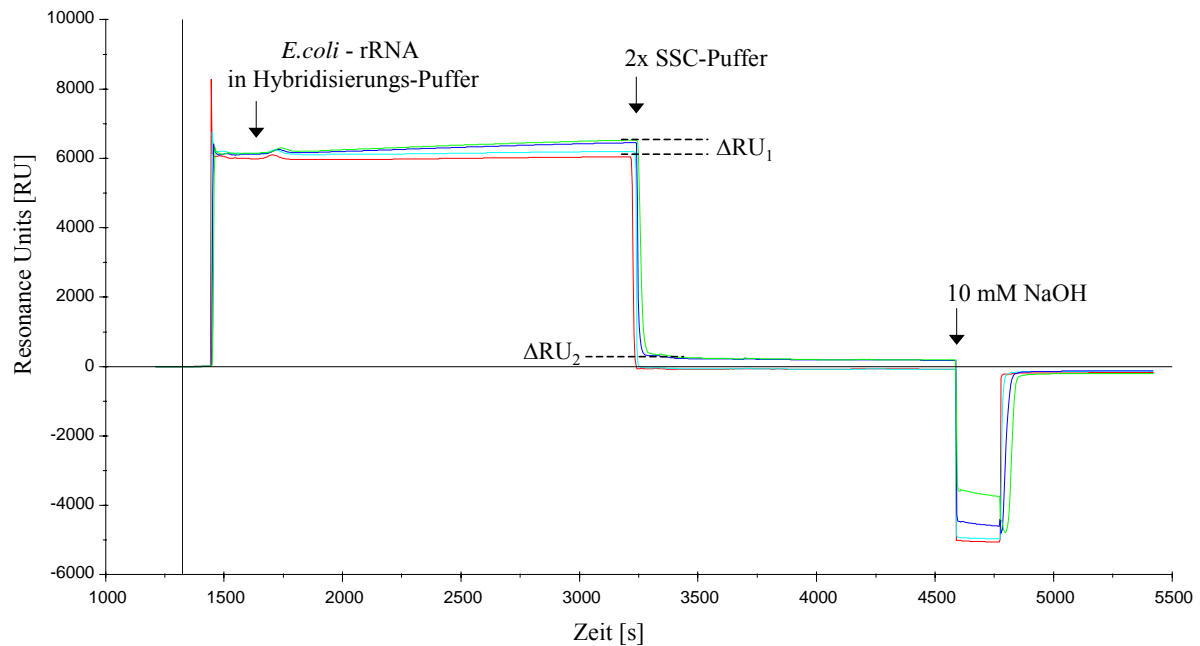


Abb. 3.4: Sensorgramm erstellt am BIACORE®. Die Bindung von rRNA (*E. coli*) an die Sonden Gam 42a (dunkelblaue Linie) und Bet 42a (grüne Linie) war möglich.  $\Delta RU_1$  ist die Anlagerung direkt nach der Hybridisierung,  $\Delta RU_2$  nach Umschalten auf Laufpuffer mit 2x SSC. Keine Bindung erfolgte an den Sonden MT1B (rote Linie) und MT3A (hellblaue Linie). Mittels 10 mM NaOH wurde die rRNA von den Fließzellen entfernt.



Tab. 3.4: Anlagerung ( $\Delta RU$  entspricht der Masseanlagerung in pg) der rRNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 an die Sonden MT1B und MT3A sowie der *E. coli*-rRNA an die Sonden MT1B, MT3A, Gam 42a und Bet 42a im BIACORE®. Eine Bindung von 0.2 bis 0.3 ng ( $\Delta RU_2 = 322$  und 339) gelang mit der rRNA von *E. coli* an die Sonden Gam- und Bet 42a in 2x SSC als auch in Hybridisierungen (Hyb.)-Puffer (Kap. 2.7.3).

Fließzelle mit Sonde	Gesamt-RNA (8 $\mu g$ )				rRNA <i>E. coli</i> (20 $\mu g$ )			
	MT1		MT3		(in 2x SSC-Puffer)		(in Hyb.-Puffer)	
	$\Delta RU_1$	$\Delta RU_2$	$\Delta RU_1$	$\Delta RU_2$	$\Delta RU_1$	$\Delta RU_2$	$\Delta RU_1$	$\Delta RU_2$
MT1B	161	7	166	50	214	0	41	0
MT3A	146	0	103	0	219	0	48	0
Gam 42a	-	-	-	-	720	322	338	220
Bet 42a	-	-	-	-	830	339	371	240

An den Sonden MT1B und MT3A war bei keiner der Hybridisierungen in 2x SSC-Puffer eine dauerhafte Anlagerung messbar (Tab. 3.4). Nach einer ersten Anlagerung während der Hybridisierung ( $\Delta RU_1$ ) hat sich ein Großteil der rRNA durch das Waschen mit 2x SSC-Puffer wieder abgelöst ( $\Delta RU_2 = 0 - 50$ ). Die Bindung der rRNA isoliert aus den Stämmen MT1 und MT3 erfolgte jeweils besser an die Sonde MT1B (spezifisch für MT1) als an die Sonde MT3A (spezifisch für MT3). Eine beständige Anlagerung wurde lediglich mit der rRNA von *E. coli* an die Sonden Gam- und Bet 42a gemessen, bei der die Hybridisierung sowohl in 2x SSC-Puffer und Hybridisierungspuffer (Hyb.-Puffer, Kap. 2.7.3) durchgeführt wurde ( $\Delta RU_2 = 220 - 339$ ; siehe Tab. 3.4 und Abb. 3.4).

Im BIACORE® wurden während einer Hybridisierung weniger als 0.4 ng rRNA pro Fließzelle gebunden, obgleich eine hohe Menge (bis 20  $\mu g$ ) an Gesamt-RNA eingesetzt wurde (Tab. 3.4). Um für eine Isotopenanalyse eine ausreichende rRNA-Menge zu erhalten, hätten mehr als 2000 Bindungs- und Elutionsdurchgänge durchgeführt werden müssen (Kap. 3.2). Deshalb wurde die Separation der rRNA am BIACORE® zur Messung der Isotopenwerte nicht weiterverfolgt.

## 3.2 Messungen am Elementaranalysator-

### Isotopenmassenspektrometer (EA-IRMS)

Das Isotopenmassenspektrometer (IRMS) misst das Verhältniss von  $^{13}C$  zu  $^{12}C$  in einer Probe im ng-Bereich (Goodman und Brenna, 1992). Bevor eine Messung der  $\delta^{13}C$ -Isotopenwerte geringer Mengen RNA erfolgen konnte, wurde die minimale Signalstärke am IRMS bestimmt. Dafür wurden Proben mit 0 bis 2  $\mu g$  23S- und 16S-rRNA von *E. coli* analysiert. Abb. 3.5 zeigt die lineare Korrelation zwischen der eingesetzten RNA-Menge und dem Ausgabesignal der Probe durch das IRMS und gleichzeitig die Abhängigkeit des gemessenen Isotopenwertes ( $\delta^{13}C$  in ‰ gegen PDB) von der Höhe des Signals im IRMS (Amplitude in V).

Bei der unmarkierten rRNA-Probe wurde der  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwert von  $-20\text{ ‰}$  mit einer Standardabweichung von  $0.7\text{ ‰}$  aus fünf Parallelmessungen bei einem Einsatz von  $1\text{ }\mu\text{g}$  rRNA, bei  $2\text{ }\mu\text{g}$  rRNA mit einer Standardabweichung von  $0.1\text{ ‰}$  gemessen (Abb. 3.5). Die Isotopenwerte der Messungen geringerer rRNA-Mengen waren  $\delta^{13}\text{C} = -22.3$  bis  $-24.0\text{ ‰}$  mit Standardabweichungen von  $1.3$  bis  $2.6\text{ ‰}$ .

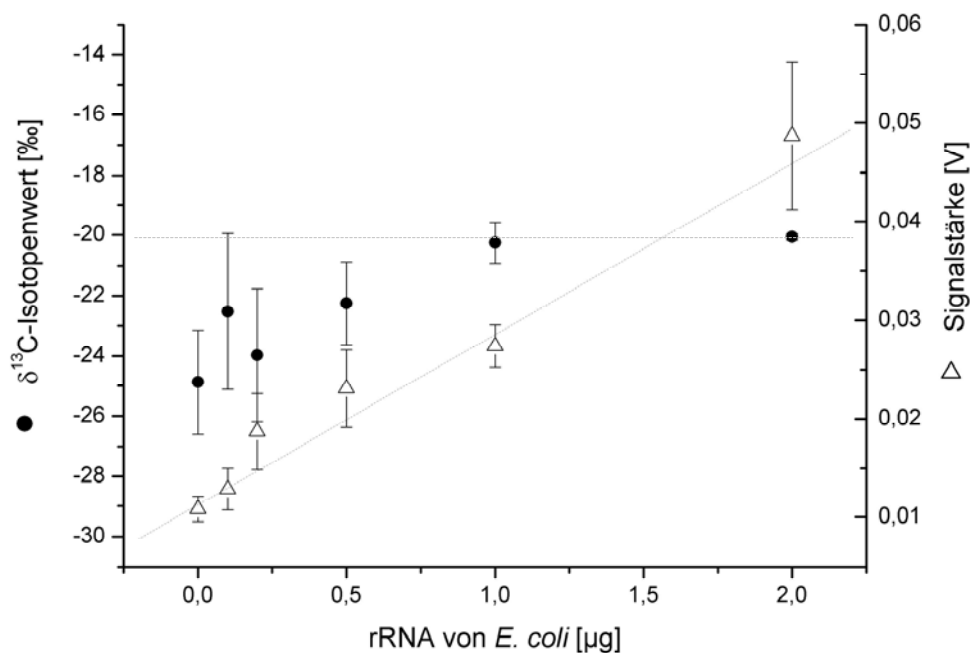


Abb. 3.5: Ermittlung der minimalen rRNA-Mengen zur Messung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwertes am EA-IRMS. Während die Signalstärke ( $\Delta$ ) mit zunehmender Kohlenstoffmenge linear zunimmt, wird bei der unmarkierten RNA-Probe von *E.coli* der Isotopenwert ( $\bullet$ ) von  $-20\text{ ‰}$  erst bei dem Einsatz von  $1\text{ }\mu\text{g}$  RNA erreicht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von fünf Parallelmessungen.

Für die Messung am EA-IRMS muss die zu analysierende Probe in einen Tiegel aus Zinn oder Silber gefüllt und wasserfrei in das Gerät eingebracht werden. Um mögliche Kontaminationen durch die Tiegel auszuschließen, wurde der Blindwert der leeren Tiegel ohne und mit vorangegangener Wärmebehandlung (über Nacht bei  $180^\circ\text{C}$ ) und der von reinem MQ-Wasser, DEPC-behandeltem MQ-Wasser und PBS-Puffer in wärmebehandelten Zinntiegeln aufgenommen. In der Signalstärke, die bei allen Messungen (je 5 Parallelen) zwischen  $5$  und  $6\text{ mV}$  lag, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den wärmebehandelten leeren Zinntiegeln, den Silbertiegeln, dem DEPC-behandeltem Wasser und dem PBS-Puffer.

Da in dieser Arbeit mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten gearbeitet wurde, wurde der Einfluss von geringen Mengen einer  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Probe auf den Isotopenwert am EA-IRMS bestimmt. Dafür wurde eine Mischung aus  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat und unmarkiertem Na-Acetat im Verhältnis 1:1000 hergestellt und der Isotopenwert von 0.04 bis 2.5  $\mu\text{g}$  Acetat gemessen (Abb. 3.6).

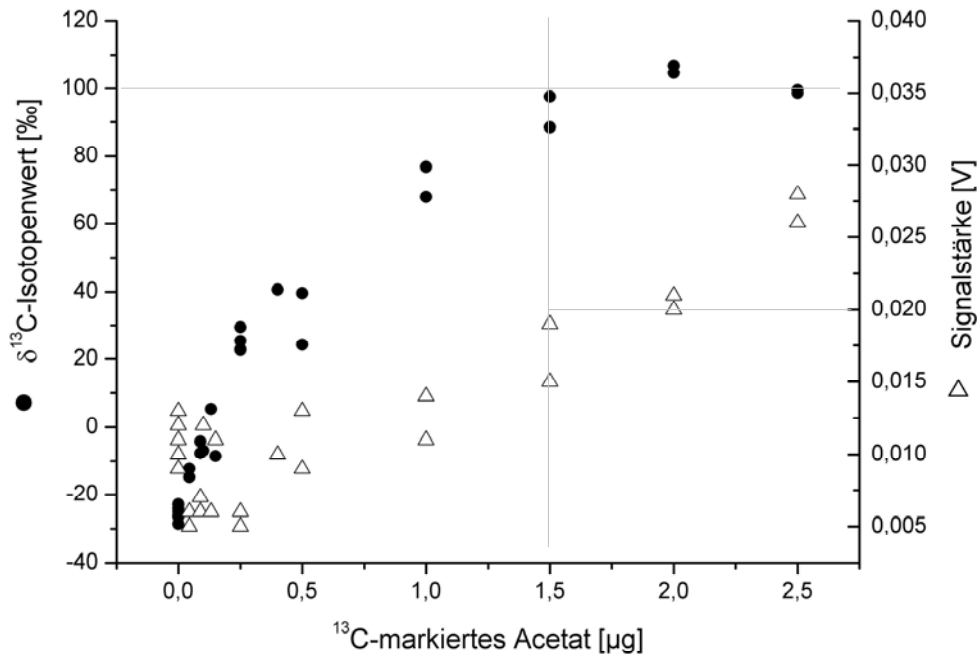


Abb. 3.6: Isotopenwerte geringer Mengen von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -markiertem Acetat (●) und Signalstärken am EA-IRMS (Δ). Der durch die Verdünnung von markiertem mit nicht markiertem Acetat errechnete Isotopenwert von 100 ‰ wird bei einer Menge über 1.5  $\mu\text{g}$  markiertem Acetat und einer Signalstärke von 0.02 V erreicht. Eine deutliche Isotopenanreicherung gegenüber 0  $\mu\text{g}$  Acetat ist bereits ab 0.04  $\mu\text{g}$  Acetat sichtbar.

Bei geringen Mengen von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -markiertem Acetat konnte der erwartete Isotopenwert von 100 ‰ bei 2.0  $\mu\text{g}$  Acetat gemessen werden, was einer Kohlenstoffmenge von 0.8  $\mu\text{g}$  bzw. einer RNA-Menge von 2.2  $\mu\text{g}$  entspricht. Wie schon bei der Messung mit unmarkierter *E. coli*-rRNA (Abb. 3.5) wurde festgestellt, dass bei zu geringer Menge an markiertem Acetat und dem damit zu geringen Kohlenstoffgehalt der Isotopenwert auf den Wert der zuvor nur mit Wasser gefüllten Tiegel absank. Andererseits konnte bereits bei einer Menge von 0.04  $\mu\text{g}$   $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -markiertem Acetat mit einem Signal von 6 mV eine deutliche Anreicherung ( $\delta^{13}\text{C} = -13.5$  ‰) gegenüber dem unmarkierten Acetat ( $\delta^{13}\text{C} = -24.9$  ‰) nachgewiesen werden. Bei geringen Mengen zwischen 0.04 und 1  $\mu\text{g}$  Acetat erfolgte daher kein quantitativer, aber dennoch ein qualitativer Nachweis der  $^{13}\text{C}$ -markierten Moleküle.

### 3.3 Separation $^{13}\text{C}$ -markierter rRNA

Die Abtrennung von spezifischer 23S-rRNA erfolgte mit Streptavidin-markierten Oligonukleotid-Sonden (Kap. 3.1.2). Im folgenden wurde die Minimalmenge an markierter Gesamt-RNA bestimmt, die vor einer Hybridisierung eingesetzt werden muss, um ein Markierungssignal am EA-IRMS messen zu können. Dafür wurden unterschiedliche Mengen von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -markierter RNA (0 bis 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3) mit der biotinylierten Sonde (Gam 42a für MT1 und Bet 42a für MT3) hybridisiert und die separierte rRNA am EA-IRMS analysiert (Abb. 3.7). Ein Aliquot der Elutions-Lösung, die gleiche Menge, die für die EA-IRMS-Messung genutzt wurde, wurde zur Kontrolle der Separation gelelektrophoretisch aufgetrennt. Bei der eingesetzten Menge von 0.3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA war hier die 23S-rRNA Bande sichtbar.

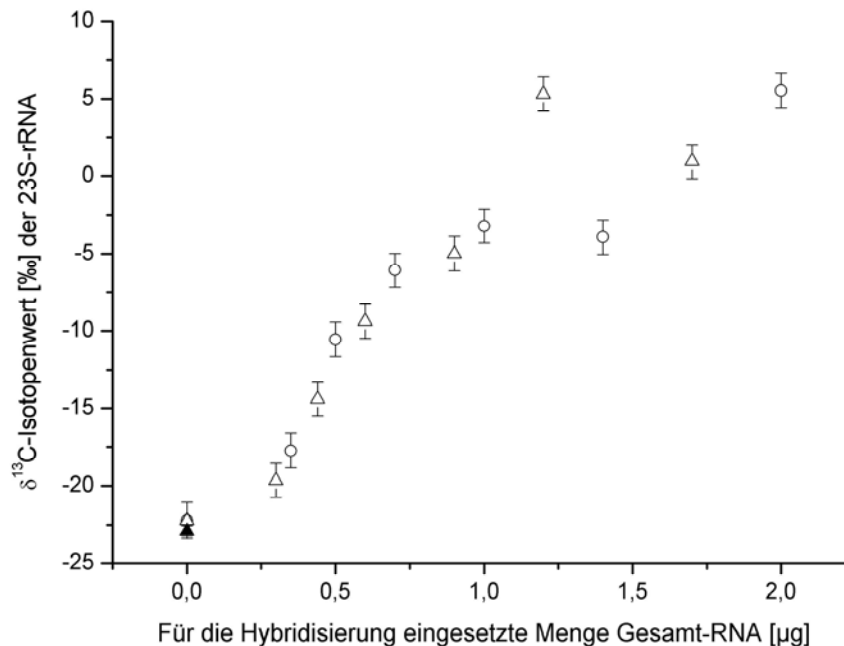


Abb. 3.7: Abhängigkeit des  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwertes der 23S-rRNA (MT1  $\circ$ ; MT3  $\Delta$ ) in der Elutionslösung von der Menge der in der Hybridisierung eingesetzten Gesamt-RNA. Mit steigender Menge  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA nahm der  $^{13}\text{C}$ -Anteil in der separierten 23S-rRNA zu. Eine Anreicherung gegenüber der Elutionslösung ohne RNA ist bereits ab 0.3  $\mu\text{g}$  RNA sichtbar.  $\blacktriangle$  = Isotopenwert der zur Separation genutzten paramagnetischen Partikel.

Der Nachweis der  $^{13}\text{C}$ -Markierung in der 23S-rRNA ist bei den Mengen der zur Hybridisierung eingesetzten Gesamt-RNA von 0.3 bis 2  $\mu\text{g}$  nicht quantitativ, da sich die Messung noch nicht im linearen Messbereich des EA-IRMS befand (Kap. 3.2). Mit einer eingesetzten Menge von 0.3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA nach der Separation und Elution des 23S-rRNA-Moleküls mit den paramagnetischen Partikeln wurden jedoch sichtbare Anreicherungen gegenüber der Probe ohne RNA gemessen (Abb. 3.7).

### 3.3.1 Spezifische Separation geringer Anteile $^{13}\text{C}$ -markierter RNA

Die Spezifität der separierten 23S-rRNA musste durch die Hybridisierung mit den Oligonukleotid-Sonden gewährleistet sein. Zur Erhöhung der Spezifität wurde die Formamid-Konzentration im Hybridisierungs-Puffer von 0 % bis 50 % variiert, was aber nur geringe Auswirkungen zeigte, und die Menge von unmarkierter Komplementär-Sonde erhöht. Die Bindung dieser Komplementär-Sonde erfolgte an homologen Bereichen der rRNA der Stämme, welche nicht separiert werden sollen, mit dort komplementärer Sequenz und verhindert so die Falschpaarung der markierten Sonde (Fuchs *et al.*, 2000). Mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -markierter Gesamt-RNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 wurden die Hybridisierungs-Bedingungen vor der Separation mit paramagnetischen Partikeln kontrolliert. Die spezifische Abtrennung der markierten 23S-rRNA durch die „passende“ Oligonukleotid-Sonde war sowohl im Agarosegel als auch nach der Bestimmung der Isotopenwerte der 23S-rRNA in der Elutions-Lösung im EA-IRMS deutlich (Abb. 3.8).

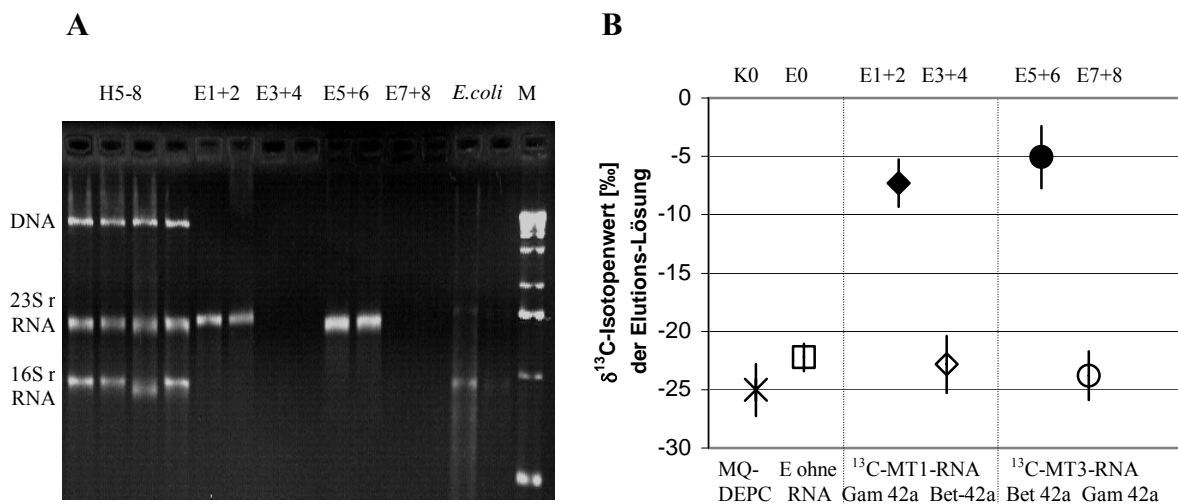


Abb. 3.8: A: 1.5 %-iges Agarosegel mit ungebundener Gesamt-RNA aus der Hybridisierungslösung (H5 - 8) und 1/3 Volumen der Elutionslösung (E1 - 8) nach Abtrennung der 23S-rRNA mit Gam 42a-Sonde (E1 + 2 und E7 + 8) und Bet 42a-Sonde (E3 + 4 und E5 + 6). E1 - 4 mit  $^{13}\text{C}$ -RNA von *Pseudomonas* sp. MT1 und E5 - 8 mit  $^{13}\text{C}$ -RNA von *Achromobacter* sp. MT3. *E.coli* 100 und 50 ng 23S- und 16S-rRNA (Roche); M = 1kb-Marker (Gibco). B:  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Elutionslösungen (Doppelbestimmung vereint, n = 3 mit Standardabweichung), E0 = Elutionslösung nach Hybridisierung ohne RNA und K0 nur MQ-DEPC in Zinntiegeln. Eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung ist nur in der Elutionslösung nach magnetischer Separation mit der „passenden“ Sonde sichtbar.

Der Einfluss der relativen RNA Menge der einzelnen Stämme auf den Isotopenwert der separierten 23S-rRNA wurde mittels Hybridisierungen unterschiedlicher Mengenverhältnisse von *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 in der Gesamt-RNA mit den Sonden Gam- und Bet 42a (Abb. 3.9) bestimmt. Für die Unterscheidung der eluierten 23S-rRNA am Isotopenmassenspektrometer war die Gesamt-RNA nur eines Stammes  $^{13}\text{C}$ -markiert.

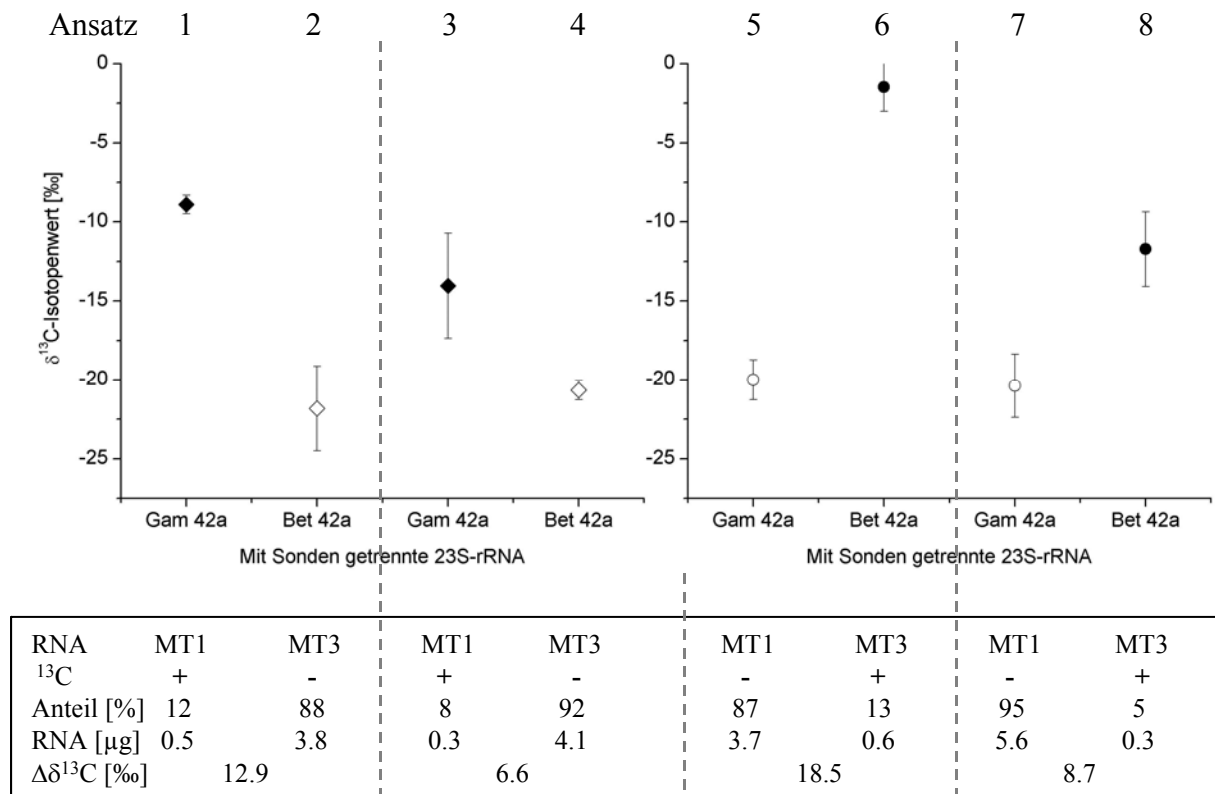


Abb. 3.9: Isotopenwerte der separierten 23S-rRNA nach Hybridisierungen mit Gesamt-RNA gemischt aus  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA (◆, ●) mit nicht markierter RNA (◇, ○) von *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3. In den Ansätzen 1 - 4 war die RNA von MT1  $^{13}\text{C}$ -markiert, in den Ansätzen 5 - 8 war die RNA von MT3 markiert. Hybridisiert wurde mit den Sonden Gam 42a und Bet 42a. Bei 5 % Anteil markierter RNA (Ansatz 8) ist die Anreicherung in der 23S-rRNA noch nachweisbar.

Die Isotopenwerte der eluierten 23S-rRNA aus Mischungen von  $^{13}\text{C}$ -markierter und unmarkierter Gesamt-RNA nach der Hybridisierung mit den Sonden Gam 42a und Bet 42a sind in Abb. 3.9 dargestellt. Bei 12 % Anteil an  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA von *Pseudomonas* sp. MT1 in der Gesamt-RNA (Abb. 3.9, Ansatz 1) wurde eine Anreicherung von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 12.9$  ‰ gegenüber dem Isotopenwert der nicht  $^{13}\text{C}$ -markierten rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 gemessen (Abb. 3.9, Ansatz 2), 8 %-iger Anteil in der Gesamt-RNA führte zu einer Anreicherung in der eluierten rRNA von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 6.6$  ‰ (Abb. 3.9, Ansatz 3 und 4). Die Ansätze mit  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA von *Achromobacter* sp. MT3 zeigten ähnliche Werte (Abb. 3.9, Ansatz 5 - 8).

Die geringeren Isotopenwerte der markierten 23S-rRNA bei den kleineren prozentualen Anteilen in der Gesamtmischung waren auch durch die geringen Kohlenstoffmengen bedingt (Kap. 3.3). Bei der Mischung mit 5 %  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA des Stammes *Achromobacter* sp. MT3 entsprach das nur 0.3 μg markierter Gesamt-RNA, gegenüber 5.6 μg nicht markierter

Gesamt-RNA von *Pseudomonas* sp. MT1, die für die Hybridisierung eingesetzt wurden. Trotz dieser geringen Mengen war es möglich, Anteile von 12 % und 8 % markierter RNA von MT1 (Abb. 3.9, Ansatz 1 - 4) sowie 15 % und 5 % markierter RNA von MT3 (Abb. 3.9, Ansatz 5 - 8) aus der nicht markierten RNA abzutrennen und die  $^{13}\text{C}$ -Markierung am EA-IRMS nachzuweisen.

### 3.3.2 Kontrollen zur Reinheit der 23S-rRNA nach der Separation

Die Isotopenwerte der separierten 23S-rRNA können durch mehrere Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. durch geringe Mengen an Kohlenstoff, bei denen der lineare Messbereich des EA-IRMS nicht erreicht wird (Kap. 3.2). Des weiteren sind eine isotopenspezifische Fraktionierung oder kinetische Einflüsse in der Synthese der 23S-rRNA möglich, die einen geringeren Isotopenwert gegenüber der Gesamt-RNA bewirken. Schließlich wird am IRMS ein prozentualer und nicht absoluter Wert zur Beschreibung der  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in einer Probe gemessen. Kommt es bei geringen Mengen von zu analysierender  $^{13}\text{C}$ -markierter rRNA zu einer Kontamination, ist einer Verschiebung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwertes nach unten bis maximal zum Wert der Kontaminate die Folge. Diese kann aus anderen nicht  $^{13}\text{C}$ -angereicherten kohlenstoffhaltigen Verbindungen bestehen, sei es aus nicht markierter 23S-rRNA eines anderen Stammes, weiteren RNA- oder DNA-Molekülen oder Verbindungen, die durch die Hybridisierung eingeführt wurden, wie Hybridisierungslösung, Waschpuffer oder paramagnetische Partikel.

Da am EA-IRMS der Isotopenwert allen Kohlenstoffs im Zinntiegel unabhängig von seiner Herkunft gemessen wird, musste die Reinheit der rRNA-Probe nach der Elution sichergestellt werden. Zur Überprüfung von Kontaminationen unabhängig von RNA- oder DNA-Molekülen in der Elutionslösung wurden Hybridisierungen ohne Zugabe von Gesamt-RNA durchgeführt. Hierbei sollte keine Bindung an die Sonden und paramagnetischen Partikel erfolgen. Die Elutionslösungen wurden zu geringen Mengen einer  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat-Lösung gegeben und der Isotopenwert des markierten Acetats mit und ohne Elutionslösung analysiert (Abb. 3.10).

Bei den geringen Mengen von 0.25 bis 1.5  $\mu\text{g}$  analysierten Acetats, welche am EA-IRMS Signale von 6 bis 16 mV ergaben, sank der Isotopenwert bereits ohne Zugabe der Elutionslösung von 94 ‰ bei 1.5  $\mu\text{g}$  (16 mV) auf 35 ‰ und 25 ‰ bei 0.5  $\mu\text{g}$  (10 mV) und 0.25  $\mu\text{g}$  (6 mV) (Abb. 3.10). Nach Zugabe einer Elutionslösung, in der keine RNA vorhanden war, wurde eine Verringerung des Isotopenwertes des markierten Acetats um durchschnittlich 34 ‰ gemessen, was einer Verschiebung um 0.037 atom%  $^{13}\text{C}$  entspricht. Die Signalstärke am EA-IRMS erhöhte sich durch die Zugabe der Elutionslösung zu Acetat um 8 bis 10 mV, welche bei Standardmessungen einer Menge von etwa 0.2  $\mu\text{g}$  Kohlenstoff zugeordnet wurde.

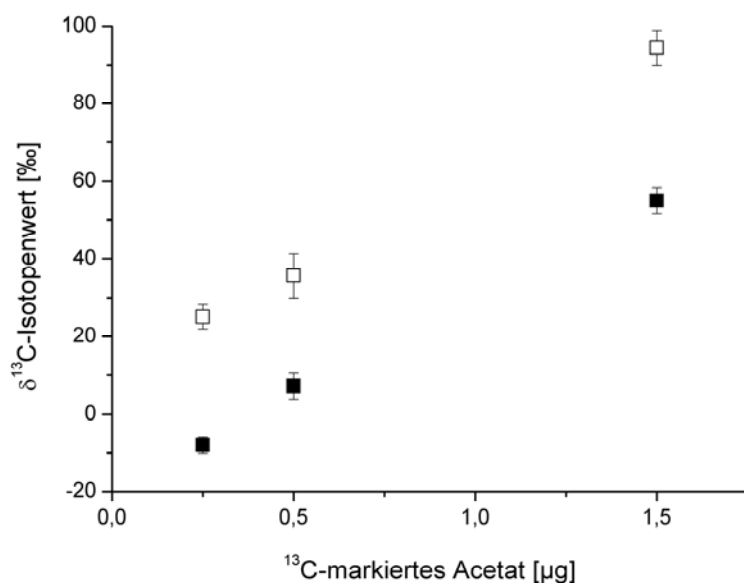


Abb. 3.10: Isotopenwerte von 0.25, 0.5 und 1.5 µg [U-<sup>13</sup>C]-markiertem Acetat ohne und mit Elutionslösung. Die Zugabe der Elutionslösung nach einer Hybridisierung ohne RNA (■) führte zu einer Verschiebung der Werte um durchschnittlich  $-33.6 \pm 5.5$  ‰ (je 3 Parallelen).

Eine mögliche Kontaminationsquelle konnten Rückstände von Kohlenstoffverbindungen aus der Hybridisierungs-Lösung sein, wie z.B. Formamid, N-Laurylsarcosin, SDS oder SSC (Kap. 2.7, Tab. 3.5), welche trotz mehrfachen Waschens mit kohlenstofffreiem PBS-Puffer vor der Denaturierung nicht aus der Elutionslösung entfernt wurden. Oder die Abtrennung der paramagnetischen Partikel erfolgte nicht zu 100 %. Daher wurden die natürlichen  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte aller in Frage kommenden Verbindungen am EA-IRMS gemessen und mittels einer Massenbalance die prozentuale Kontamination der Proben berechnet (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Isotopenwerte und theoretischer Anteil möglicher C-haltiger Verbindungen, die durch die Hybridisierung in die Elutionslösung vor Zugabe zu <sup>13</sup>C-markiertem Acetat (1.5, 0.5 und 0.25 µg; siehe Abb. 3.10) gelangt sein konnten.

C-haltige Verbindungen in der Hybridisierungs- Lösung	natürlicher Isotopenwert $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	theoretischer Anteil in der Elutionslösung [%]		
		1.5 µg Acetat	0.5 µg Acetat	0.25 µg Acetat
Formamid	-24.41	33.2	47.3	66.9
N-Laurylsarcosin	-34.08	30.7	40.8	55.9
SSC	-20.12	34.4	51.0	73.2
SDS	-26.63	32.6	45.6	64.0
Hyb.-Lösung gesamt	-26.31	32.7	45.9	64.4
Sonden biotinyliert	-19.30	34.7	51.7	74.6
SAV1	-28.56	32.1	44.3	61.7

Die in Tab. 3.5 aufgeführten theoretischen Anteile einer möglichen Kontamination in der Elutionslösung zeigen, dass bei der Menge von 1.5 µg gemessenem Acetat durchschnittlich 33 % nicht angereicherter Kohlenstoff in der Probe enthalten war. Die mittlere Kontamination



lag bei den geringeren Probemengen von 0.5 und 0.25 µg Acetat theoretisch bei 47 % und 66 %, um die gemessenen Isotopenwerte mit Elutionslösung zu erreichen.

Eine Quelle der Kontamination könnten Proteine oder Aminosäuren aus der Biotin-Streptavidin-Kopplung zwischen paramagnetischen Partikeln und Sonden sein, wenn sie sich durch die kurzfristige Erhitzung auf 70°C zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen rRNA und Sonde nach der Hybridisierung von den paramagnetischen Partikeln gelöst haben (Kap. 2.7.2.3). Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist jedoch eine der stärksten nicht kovalenten Bindungen von einem Protein zu einem kleineren Ligand in wässriger Lösung mit einer Assoziationskonstanten von  $10^{14} \text{ M}^{-1}$  und damit extrem stabil über einen weiten pH- und Temperaturbereich. Durch die extrahierte Gesamt-RNA hätten aber Spuren von Proteinen mit eingeführt werden können, welche photometrisch nicht erkannt wurden (Kap. 2.6.2). Daher wurde mit der dreifachen Menge der für eine Isotopenanalyse eingesetzten Menge an Elutionslösung eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt (Kap. 2.8.1), bei der die kleinste Standard-Verdünnung bei 100 ng BSA-Protein (Bovinserum Albumin) lag. Bei dieser Bestimmung sowie über eine Proteingelelektrophorese der gleichen Menge Elutionslösung (durchgeführt von Manuel Ferrer und Daniela Regenhardt, Mikrobielle Ökologie, GBF) mit anschließender Silberfärbung und einem Detektionsminimum bei 10 ng konnten keine Proteine nachgewiesen werden. Mögliche Kontaminationen durch Proteine in der Elutionslösung lagen unterhalb der Nachweisgrenzen und konnten damit als Hauptfaktor der zusätzlichen Kohlenstoffquelle in der Elutionslösung ausgeschlossen werden.

Durch weitere Analysen der Elutionslösung am MALDI-Massenspektrometer (Kap. 2.8.2) in der Abteilung Strukturbiologie (GBF) wurden weitere Eingrenzungen der Kohlenstoffquelle durchgeführt. In einigen Elutionslösungen (4 von 12 Proben) wurden im niedrigen Massebereich bis 2000  $m/z$  schwache Signale bei 1078 und 1094 sowie 1289 und 1305  $m/z$  detektiert. Die Massedifferenz von 16 könnte auf abgespaltene Aminogruppen hinweisen, die eventuell von Proteinen stammten. In drei weiteren Proben wurde ein geringes gleichmäßiges Hintergrundrauschen mit einer Massedifferenz von 74 gemessen, was durch das Vorkommen von Methylestern oder Carbonsäuren ( $-\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$ ) hervorgerufen werden kann. In fünf weiteren Proben war kein Signal am MALDI-MS detektierbar. Analysen kleinster Mengen der Streptavidin-bedeckten paramagnetischen Partikel ergaben Signale bei 1073 und 1147  $m/z$ . Da diese Massen in den eluierten rRNA-Lösungen nicht gemessen wurden, war die Wahrscheinlichkeit der Kontamination durch unzureichend abgetrennte Partikel gering.

Die Möglichkeit, die RNA von kohlenstoffhaltigen unmarkierten Verbindungen durch Säulen-Zentrifugations-Aufreinigung (2.6.1.2) zu befreien, führte bei einer  $^{13}\text{C}$ -markierten RNA-Probe bei geringfügig abnehmender RNA-Menge zu einer erneuten Verschiebung des

Isotopenwerts ( $-13.6 \pm 0.5 \text{ ‰}$ ,  $n = 5$ ). Entweder entfernte die Säulen-Aufreinigung stark angereicherte Verbindungen, die während der RNA-Extraktion nicht abgetrennt wurden, oder es kam zu einer erneuten Verunreinigung durch unmarkiertes Säulenmaterial oder Pufferbestandteile. Des weiteren führte das Vereinen mehrerer Elutionslösungen mit anschließender Fällung der 23S-rRNA mit Ethanol (Kap. 2.7.2.1) zu Verlusten von Nukleinsäuren, die Isotopenanalysen mit hohen Standardabweichungen innerhalb einer Probe zur Folge hatten.

Da eine genaue Bestimmung der Kontamination und damit eine Reinigung der Elutionslösung nicht möglich war, wurden für alle am EA-IRMS analysierten Proben die Elutionslösungen direkt gemessen und miteinander verglichen. Zudem wurde darauf geachtet, dass nur die Proben in spätere Berechnungen eingingen, welche ein Signal von über 20 mV erreichten (Abb. 3.6), so dass der Einfluss der möglichen geringen Menge an unmarkiertem Kohlenstoff minimiert wurde.

### 3.4 Einfluss von Isotopeneffekten in der Synthese von Biomolekülen

Der Einfluss von kinetischen Effekten sowie enzymatischer Isotopendiskriminierung, die zu einer Herabsenkung des Isotopenwertes führen können, ist sowohl bei der Biodegradation von Schadstoffen (Meckenstock *et al.*, 1999) als auch in der Synthese von Biomolekülen bekannt (Hayes, 2001). Um die Isotopeneffekte in den in dieser Arbeit analysierten Biomolekülen abzuschätzen, wurden Experimente mit den dominantesten Stämmen aus dem Chemostaten-Konsortium, *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3, in Batch-Kulturen durchgeführt. Ihnen wurde das stabile Isotop in Form von  $[U-^{13}\text{C}]$ -Acetat zum Minimalmedium zugegeben. Die Markierung erfolgte zunächst als Puls im Verhältnis 1:100  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  zu Beginn des logarithmischen Wachstums mit Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (Abb. 3.11).

Die Zugabe von  $[U-^{13}\text{C}]$ -Acetat erfolgte bei einer optischen Dichte (600 nm) der Zellen von *Pseudomonas* sp. MT1 von 0.08 und führte zu einem sofortigen Anstieg des Isotopenverhältnisses im Medium von  $\delta^{13}\text{C} = -29.6 \text{ ‰}$  auf 590 ‰ (Abb. 3.11). Während der Isotopenwert des Mediums 6 h nach der Markierung auf 570 ‰ absank, wurde in der Biomasse ein Isotopenwert von  $\delta^{13}\text{C} = 750 \text{ ‰}$  gemessen, der sich 24 h nach Zugabe der Markierung noch auf  $\delta^{13}\text{C} = 905 \text{ ‰}$  gesteigert hatte. Die Isotopenwerte der extrahierten Gesamt-RNA von *Pseudomonas* sp. MT1 waren mit einer Differenz von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = -393 \text{ ‰}$  (6 h) und  $-417 \text{ ‰}$  (24 h) deutlich niedriger als die Werte der Biomasse (Abb. 3.11). Durch eine anschließende Aufreinigung der Gesamt-RNA mit Säulenzentrifugation (Kap. 2.6.1.2)

wurde der Isotopenwert gegenüber PDB weiter nach unten von  $\delta^{13}\text{C} = 356 \text{ ‰}$  auf  $219 \text{ ‰}$  nach 6 h und von  $\delta^{13}\text{C} = 489 \text{ ‰}$  auf  $312 \text{ ‰}$  nach 24 h verschoben (Kap. 3.3.2).

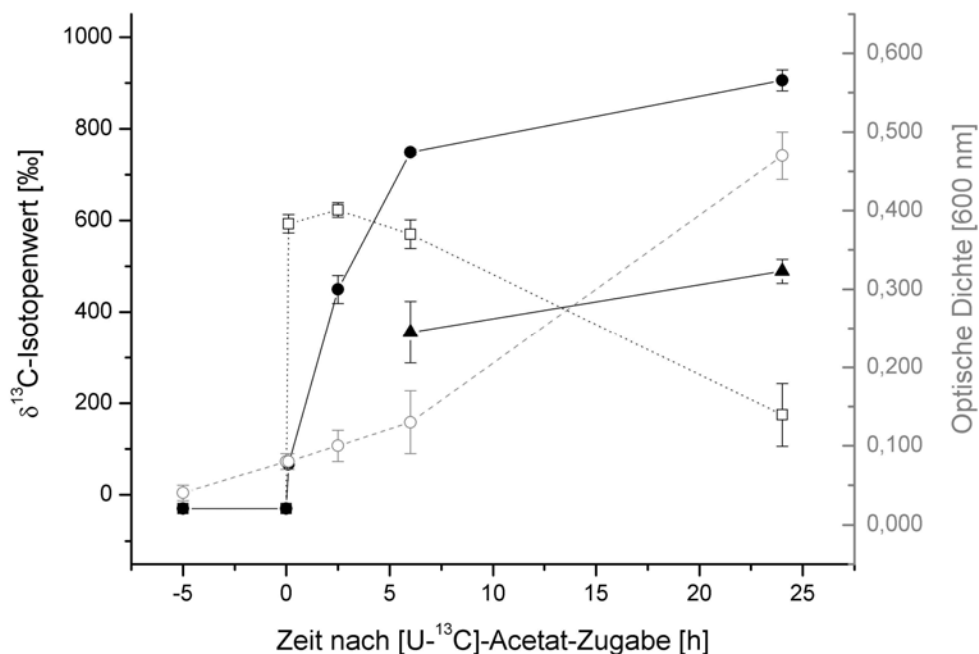


Abb. 3.11: Isotopenwerte des Minimalmediums (□), der Biomasse (●) und der Gesamt-RNA (▲) des Stammes *Pseudomonas* sp. MT1 (Mittelwert und Standardabweichung aus 3 parallelen Kulturen) nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat sowie das Wachstum der Bakterien in den Batch-Kulturen (Optische Dichte bei 600 nm ○).

Das Experiment wurde mit einer größeren Menge an  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat wiederholt (Verhältnis  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C} = 1:40$ ), wobei die Isotopenanreicherungen in der wachsenden Biomasse und 10 h nach Zugabe der Markierung auch in der Gesamt-RNA von *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 analysiert wurden (Abb. 3.12).

Die Anreicherungskurven der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 zeigten nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat zu der sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Batch-Kultur den gleichen Verlauf (Abb. 3.12). Die Isotopenwerte der 10 h nach der Markierung extrahierten Gesamt-RNA waren bei beiden Stämmen mit  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 1343 \text{ ‰}$  (MT1) und  $964 \text{ ‰}$  (MT3) geringer als die der Biomasse.

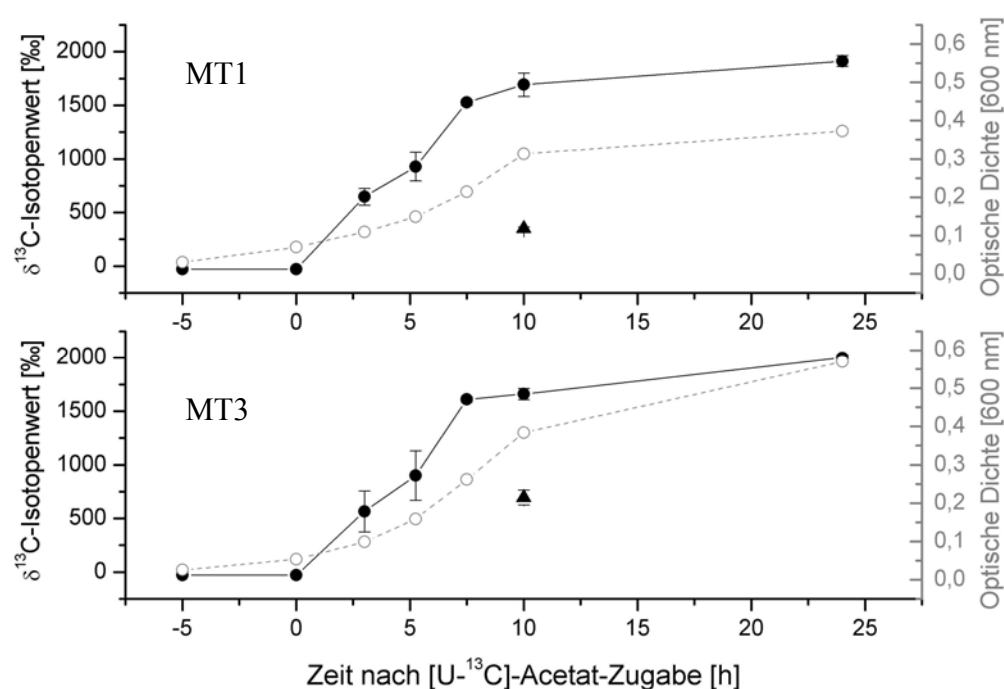


Abb. 3.12: Isotopenwerte der Biomasse (●) und der Gesamt-RNA (▲) der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 (oben) und *Achromobacter* sp. MT3 (unten) nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-Acetat (Mittelwert aus 3 Messungen) sowie das Wachstum der Bakterien in Batch-Kulturen (Optische Dichte 600 nm, ○).

In einem dritten Batch-Experiment wurde die Markierung als „Langzeitmarkierung“ durchgeführt. Hier sollte ausgeschlossen werden, dass die geringer angereicherten Biomoleküle bereits vor der <sup>13</sup>C-Markierung synthetisiert werden konnten. Die Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 wurden als Vorkultur in 5 ml Vollmedium bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 1.33 (MT1) und 1.10 (MT3) angezogen. Um wenig unmarkierte Kohlenstoffkomponenten in das Minimalmedium zu übertragen, wurden die Zellen drei mal mit PBS-Puffer gewaschen und in das [U-<sup>13</sup>C]-Acetat-markierte Medium überführt ( $t_0$ : OD<sub>600</sub> = 0.01). Acetat war im Verhältnis 1:200 mit [U-<sup>13</sup>C]-Acetat gemischt. Nach 7 h Wachstum erreichten die Kulturen optische Dichten von 0.05 (MT1) und 0.03 (MT3), nach 15 h von 0.43 (MT1) und 0.48 (MT3). Die Isotopenwerte der Biomasse und der Gesamt-RNA nach 15 Stunden Wachstum mit [U-<sup>13</sup>C]-Acetat sind in Tab. 3.6 dargestellt.

Tab. 3.6: Isotopenwerte der Biomasse und der Gesamt-RNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 nach 15 h Wachstum mit [U-<sup>13</sup>C]-Acetat (Verhältnis 1:200 <sup>13</sup>C:<sup>12</sup>C) in Batch-Kulturen sowie ihre Differenz.

	Biomasse $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	Gesamt-RNA $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	Differenz $\Delta\delta^{13}\text{C}$ [‰]
<i>Pseudomonas</i> sp. MT1	$389.9 \pm 1.1$	$218.8 \pm 26.4$	-171.1
<i>Achromobacter</i> sp. MT3	$422.9 \pm 0.5$	$253.6 \pm 16.1$	-169.2

In der Gesamt-RNA wurden Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = 219 \text{ ‰}$  (MT1) und  $254 \text{ ‰}$  (MT3) gemessen, was einer Differenz von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = -170 \text{ ‰}$  zu der mit  $390 \text{ ‰}$  und  $423 \text{ ‰}$  angereicherten Biomasse entsprach.

Der Fraktionierungsfaktor  $\epsilon$  (Kap. 2.12.5) zwischen Biomasse und Gesamt-RNA war umso höher, je größer der Anteil von  $^{13}\text{C}$  zu  $^{12}\text{C}$  im Substrat Acetat gewählt war (Tab. 3.7). Bei Probennahmen über den Zeitraum von 24 h war eine Tendenz zur Verringerung des Faktors sichtbar, die Isotopenwerte der RNA sich denen der Biomasse also annäherten. Stammspezifische Unterschiede waren vor allem bei der hohen Anreicherung mit  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  von 1:40 sichtbar. Nach 10 h Wachstum war die Fraktionierung in der Gesamt-RNA von *Pseudomonas* sp. MT1 höher als in der von *Achromobacter* sp. MT3, wobei stammspezifische Unterschiede nach 15 h Wachstum mit  $^{13}\text{C}$ -Acetat, welches von Beginn an mit einem Verhältnis von 1:200 den Kulturen zugegeben wurde, kaum detektiert wurden (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Fraktionierungsfaktor  $\epsilon$  zwischen Biomasse und Gesamt-RNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 in Batch-Kulturen mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat zu Acetat in den Verhältnissen 1:100, 1:40 und 1:200. Die Wachstumszeit bezieht sich auf Stunden nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat.

Stamm	MT1	MT3	MT1	MT1	MT1	MT3
Wachstumszeit	10 h	10 h	6 h	24 h	15 h	15 h
Verhältnis $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$	1:40	1:40	1:100	1:100	1:200	1:200
Fraktionierungs- faktor $\epsilon$	994.9	568.6	290.2	279.8	140.4	135.0

Neben dem Isotopenwert der gesamten Biomasse, welche einer Art Summenparameter des aufgenommenen Kohlenstoffs darstellt, wurden bei dem dritten Experiment zusätzlich nach 15 h Wachstum die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Fettsäuren der Phospho- und Glykolipide analysiert (Tab. 3.8). Die Abkürzungen aller analysierter Fettsäuren sind in Kap. 2.10.1.4 erklärt.

Tab. 3.8: Isotopenwerte der Fettsäuren der Phospho- und Glykolipide der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 nach 15 h Wachstum mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat im Verhältnis  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  1:200. Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 Messungen gegen PDB. nn = nicht nachweisbar.

Phospholipide			Glykolipide		
	MT1	MT3		MT1	MT3
Fettsäuren	$\delta^{13}\text{C} \text{ [‰]}$	$\delta^{13}\text{C} \text{ [‰]}$	Fettsäuren	$\delta^{13}\text{C} \text{ [‰]}$	$\delta^{13}\text{C} \text{ [‰]}$
C16:0	$257.6 \pm 0.1$	$286.6 \pm 0.1$	C12:0	nn	$-23.5 \pm 2.6$
C17:0d7,8cy	$267.6 \pm 0.2$	$295.2 \pm 0.2$	C14:0	$-24.0 \pm 4.3$	$-27.3 \pm 0.6$
C18:1 $\omega$ 9	$247.6 \pm 0.8$	$275.8 \pm 0.2$	C16:0	$-1.2 \pm 0.1$	$48.3 \pm 0.1$
C18:0	$236.9 \pm 1.9$	$268.6 \pm 3.9$	C18:1 $\omega$ 7	$-5.0 \pm 1.2$	$-7.6 \pm 1.0$
C19:0d8,9cy	$248.0 \pm 2.9$	$297.8 \pm 2.3$	C18:0	$-28.0 \pm 2.8$	$-24.5 \pm 0.6$

In allen Fettsäuren der Phospholipide (PL-FA) wurden Anreicherungen mit dem stabilen Isotop gemessen, welche jeweils zwischen denen der Biomasse und der Gesamt-RNA lagen (Tab. 3.6 und 3.8). Die Isotopenwerte betrugen bei *Pseudomonas* sp. MT1  $\delta^{13}\text{C} = 237\text{‰}$  bis  $268\text{‰}$  und bei *Achromobacter* sp. MT3  $\delta^{13}\text{C} = 269\text{‰}$  bis  $298\text{‰}$ . In den Glykolipiden wurde dagegen nur in der Palmitinsäure C16:0 ein positiver Isotopenwert detektiert ( $\delta^{13}\text{C} = 48\text{‰}$  bei *Achromobacter* sp. MT3). Die Glykolipide sind daher für die Isotopenanalyse nach einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment nicht geeignet.

### **3.5 Isotopen-Markierung des bakteriellen Konsortiums in kontinuierlicher Kultur**

Die Isotopenmarkierung und die Separation der rRNA mit Hilfe von Oligonukleotid-Sonden wurde bisher anhand von Reinkulturen überprüft. Im folgenden wurde die Methode an einem mikrobiellen Konsortium in kontinuierlicher Kultur angewendet, um den Kohlenstofffluss innerhalb der Gemeinschaft zu bestimmen. Zur Beschreibung der bakteriellen Gemeinschaft und zur Maximierung der Biomasse vor der Isotopenmarkierung wurden zwei parallele Chemostaten mit den vier Stämmen angeimpft und das mikrobielle Konsortium über einen Zeitraum von fünf Wochen analysiert (Kap. 2.4.1). Anhand von Vorversuchen, deren Daten hier nicht gezeigt werden, wurde festgestellt, dass das Konsortium über einen Zeitraum von zwei und sechs Monaten das einzige Substrat 4-Cl-Salicylat abbauen konnte, ohne dass sich Stoffwechselprodukte im Medium angereichert hatten. Neben der Zellzahl wurde die Zusammensetzung des Konsortiums mittels indirekter Immunfluoreszenz (Kap. 2.5) und genomischen Fingerprintanalysen (Kap. 2.9.2) bestimmt und der Substratverbrauch und die Konzentration von Metaboliten ermittelt (Abb. 3.13).

In beiden Chemostaten wurde das Substrat 4-Cl-Salicylat schon bei geringen Zelldichten ( $\text{OD}_{600} = 0.1$ ) nach drei Tagen abgebaut, so dass es im Medium nicht mehr nachweisbar war (Abb. 3.13). Während des 5-wöchigen Wachstums in kontinuierlicher Kultur wurden neben 4-Cl-Salicylat die Konzentrationen der möglichen Metabolite 4-Cl-Catechol, Catechol, trans- und cis-Dienlacton, Maleylacetat und cis-Acetylacrylat und des für viele Organismen toxischen Protoanemonin (Skiba *et al.*, 2002) überwacht (Kap. 2.2.1).

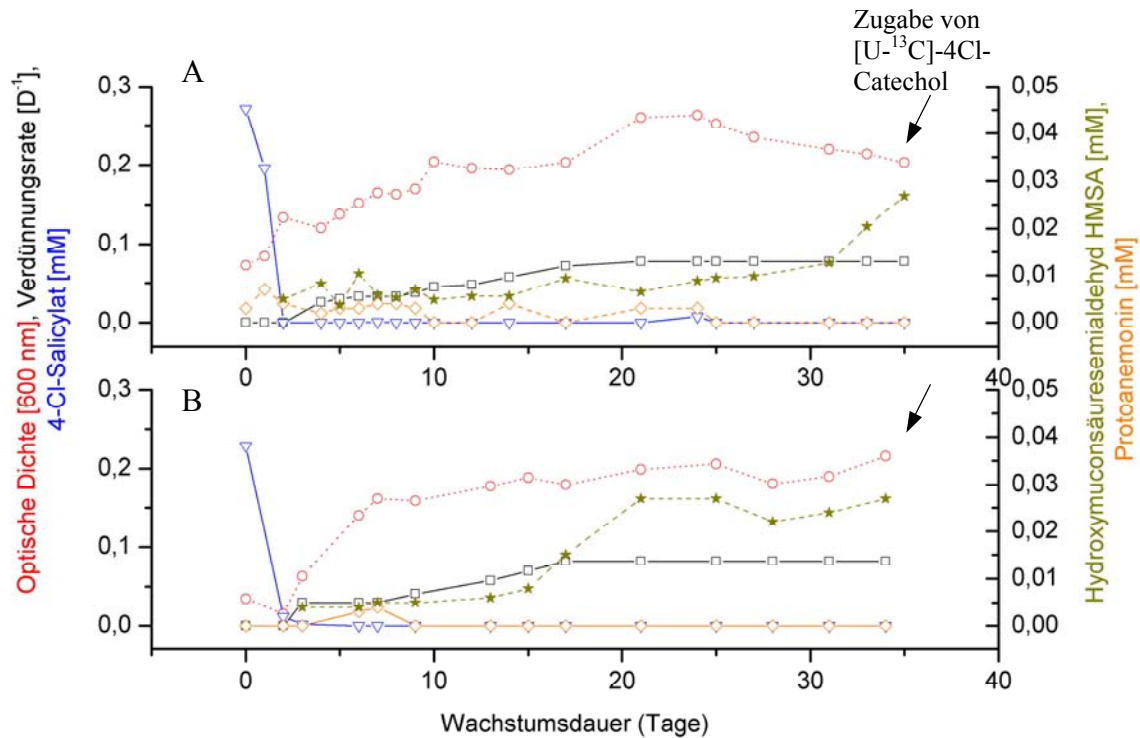


Abb. 3.13: Bakterienwachstum und Substratkonzentrationen in den Chemostaten A und B in einem Zeitraum von fünf Wochen. Bei ansteigender Verdünnungsrate ( $\square$ ) wurden die Zelldichte (Optische Dichte bei 600 nm  $\circ$ ) sowie die Konzentrationen des Substrats 4-Cl-Salicylat ( $\nabla$ ) und der Metabolite Protoanemonin ( $\diamond$ ) und Hydroxymuconsäuresemialdehyd (HMSA  $\star$ ) analysiert. Nach fünf Wochen erfolgte die Zugabe von  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol (Pfeil, siehe Kap. 3.5.2).

In einem der Chemostaten (Abb. 3.13, B) wurde nach zwei Wochen eine leichte Gelb-Braunfärbung des Mediums durch den Anstieg der Hydroxymuconsäuresemialdehyd (HMSA)-Konzentration beobachtet, einem Produkt der meta-Spaltung von Cl-Catechol (Wieser *et al.*, 1994). Im parallelen Chemostat (Abb. 3.13, A) war diese Konzentrationszunahme nach 30 Tagen sichtbar. Da sich die 4-Cl-Salicylat- und Protoanemonin-Konzentrationen aber nicht veränderten, das Substrat also weiterhin gut abgebaut wurde und sich keine toxischen Zwischenprodukte anreicherten, wuchsen die Bakterien ab dem 17. Tag in kontinuierlicher Kultur mit gleichbleibender Verdünnungsrate von 0,08, was einem vollständigen Austausch des Chemostatenvolumens innerhalb von zwölf Tagen entsprach.

### 3.5.1 Prozentuale Verteilung der vier Stämme im Chemostaten

Die prozentuale Verteilung der vier Stämme im Chemostaten wurde ermittelt, um Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft zu registrieren sowie Kontaminationen im Chemostaten zu erkennen. Weiterhin sollte die Verteilung einen Anhaltspunkt für die Anteile der rRNA eines Stammes im Gesamt-RNA-Gemisch des Konsortiums vor der Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden geben. Der prozentuale Anteil der Stämme wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (Kap. 2.5) bestimmt, während das Vorkommen der vier Stämme im Chemostaten zusätzlich mittels einer genomischen Fingerprintanalyse (BOX-PCR, Kap. 2.9.1) kontrolliert wurde. Die BOX-PCR diente der molekularbiologischen Kontrolle des Konsortiums und der Überprüfung, ob Kontaminationen durch andere Mikroorganismen vorlagen. Bei dieser PCR werden stamm-spezifische Fingerabdrücke aus amplifizierten Fragmenten des bakteriellen Genoms erhalten, die von repetitiven Primer-Bindungsstellen flankiert werden (Rademaker *et al.*, 1998). Chemostatenproben wurden entweder direkt in der PCR eingesetzt oder isoliert und Einzelkolonien untersucht.

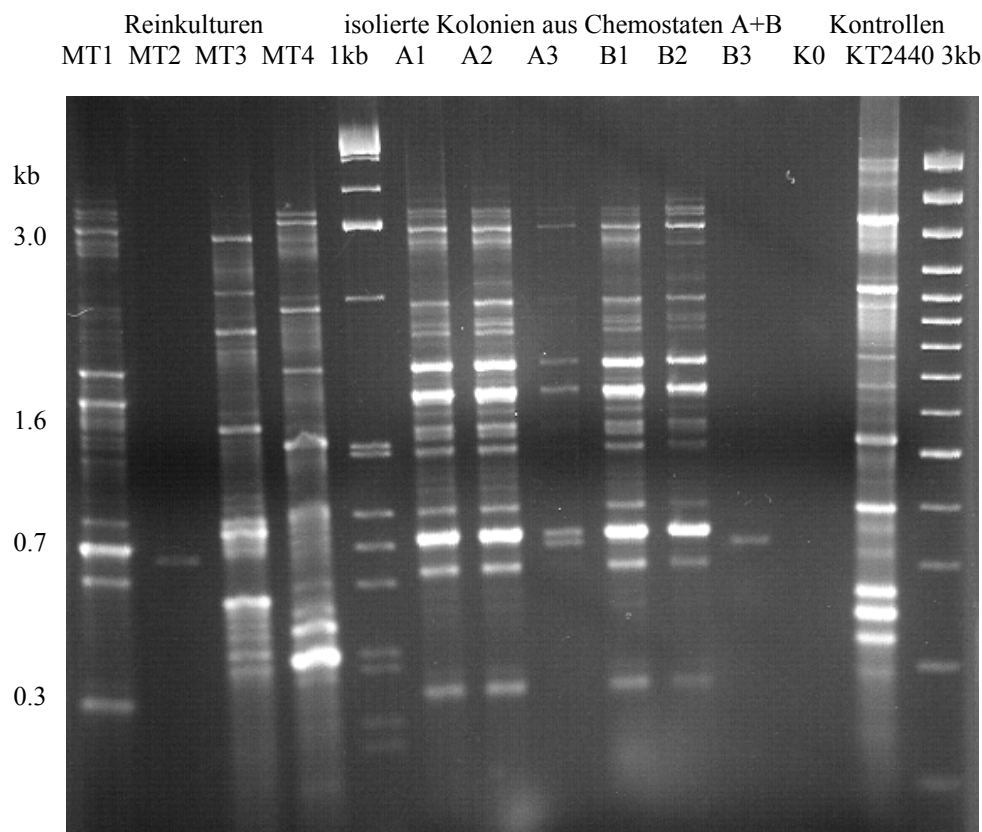


Abb. 3.14: Repetitive Fingerprintanalyse der Reinstämme MT1 - MT4 und isolierter Kolonien aus den Chemostaten A und B (A1 - B3) mittels BOX-PCR. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im 3%-igen TAE-Agarosegel bei 80 V über 5 h. Die Bandenmuster der Proben A1, A2, B1 und B2 entsprachen dem Muster von *P. sp.* MT1, B3 dem von *E. sp.* MT2. A3 war eine gemischte Probe der Stämme MT2 und MT1. K0 = Negativkontrolle ohne DNA. KT2440 = Positivkontrolle mit DNA des Stammes *P. putida* KT 2440. Als Marker dienten die 1kb- und 3kb-Leiter von Gibco.



Die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten BOXA1-Elemente (Abb. 3.14) ergab für jeden Stamm einen spezifischen Fingerabdruck. *Empedobacter* sp. MT2 zeigte lediglich eine Bande, während die Stämme MT1, MT3 und MT4 ein komplexes Bandenmuster von 0.3 bis 3 kb aufwiesen. Die auf Agarplatten vereinzelt Kolonien aus der Chemostatenkultur (A1 - B3) ließen sich den Stämmen MT1 und MT2 zuordnen. Das Bandenmuster der Proben direkt aus dem Chemostaten entsprach der Summe der Einzelstämme, bei denen die Banden des Stammes *Pseudomonas* sp. MT1 dominierten. Während der Anzucht der Chemostatenkulturen für das  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment (Kap. 3.5.2) wurden keine Kontaminationen durch weitere Stämme detektiert.

Die prozentuale Verteilung der Stämme im Chemostaten wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt (Kap. 2.5). Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Oberflächen-Proteine der vier Stämme und einem markierten sekundären Antikörper war es möglich, die Bakterien einzeln unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen (Abb. 3.15 und 3.16: Zellen mit grüner und roter Ringfluoreszenz). In Kombination mit der DAPI-DNA-Färbung, die alle Bakterien erfasst (in den Abb. 3.15 und 3.16 blau gefärbte Zellen), wurde eine relative Verteilung der einzelnen Stämme ermittelt.

Während die Bakterien im Chemostaten zu Beginn des kontinuierlichen Wachstums vereinzelt waren (Abb. 3.15), haben sich die Zellen von *Pseudomonas* sp. MT1 nach drei bis vier Wochen zusammengelagert (Abb. 3.16). In Abbildung 3.16 sind die Zellen in Chemostat B nach 4.5 Wochen Wachstum während des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsversuchs dargestellt. Die Zellen wurden mit allen Antikörpern markiert, so dass unter dem FITC-Filter die grünen MT1-Zellen und im Cy3-Filter die unterschiedlichen Morphologien von MT2 bis MT4 sichtbar sind (Abb. 3.16). Die Bakterien des Chemostaten A verhielten sich identisch.

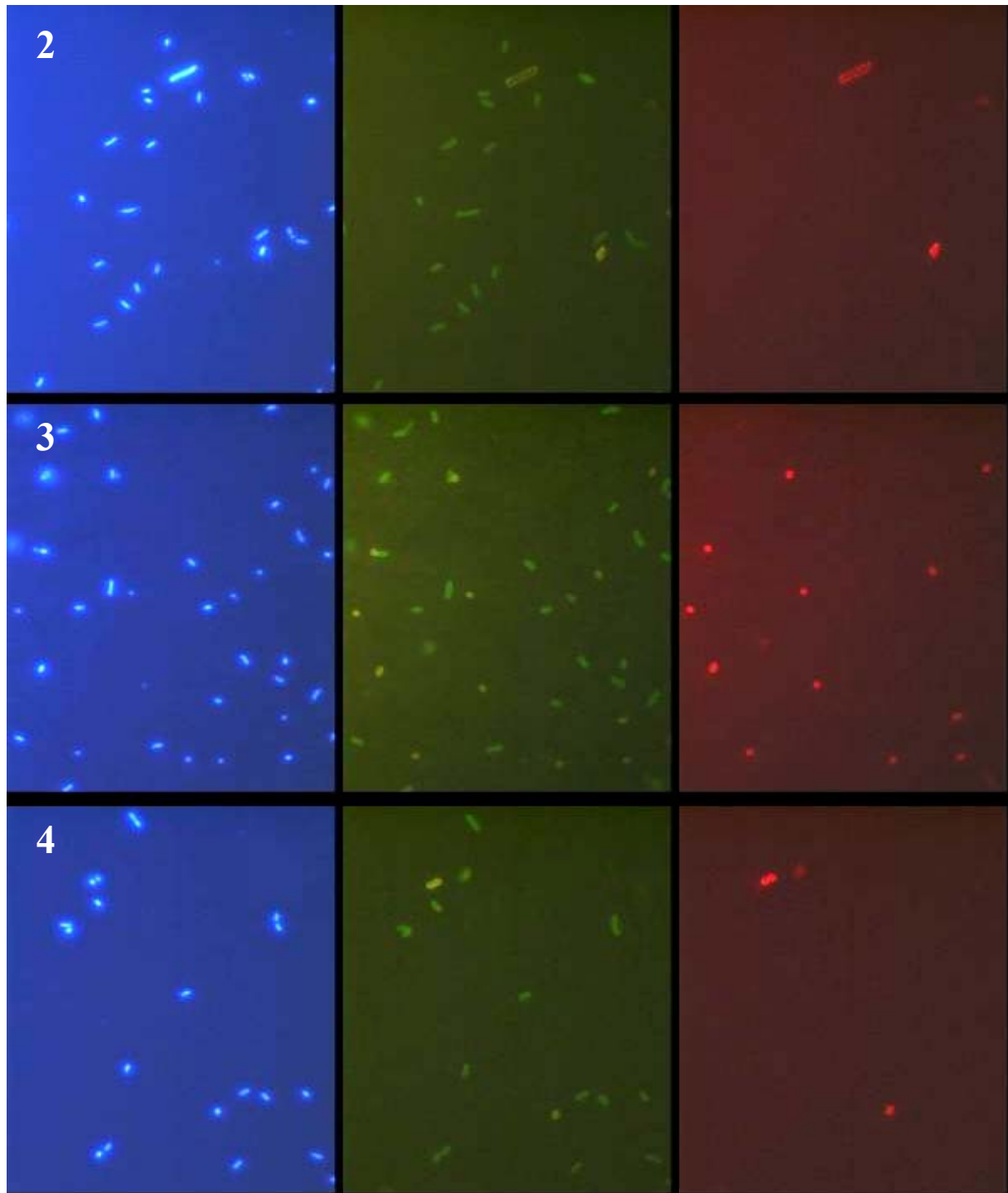


Abb. 3.15: Fluoreszenzmarkierte Stämme des Chemostaten-Konsortiums nach 2 Wochen Wachstum in kontinuierlicher Kultur. Blau: DAPI-Färbung der DNA aller Bakterien, grün: FITC-markierter sekundärer Antikörper gegen MT1, rot: Cy3-markierter Antikörper gegen MT2 (Reihe 2), MT3 (Reihe 3) oder MT4 (Reihe 4).

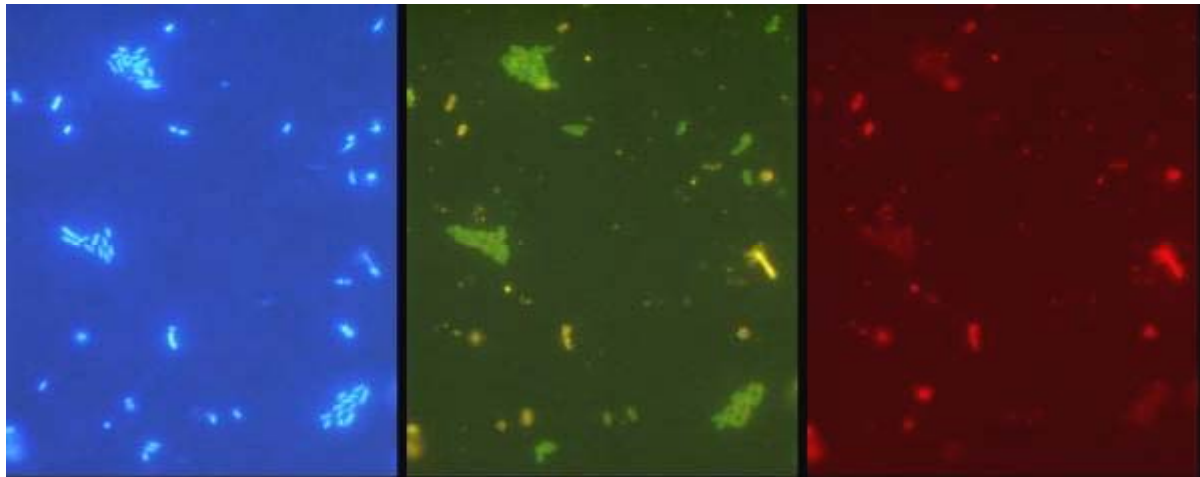


Abb. 3.16: Fluoreszenzmarkierte Stämme des Chemostaten B nach 4.5 Wochen Wachstum während des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments. Blau: DAPI-Färbung der DNA aller Bakterien, grün: FITC-markierte sekundäre Antikörper gegen MT1, rot: Cy3-markierte Antikörper gegen MT2, MT3 und MT4.

Die bakterielle Zusammensetzung der beiden Chemostaten, die für die Markierung mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  inokuliert wurden, ist in Abb. 3.17 zum Zeitpunkt der  $^{13}\text{C}$ -Markierung dargestellt.

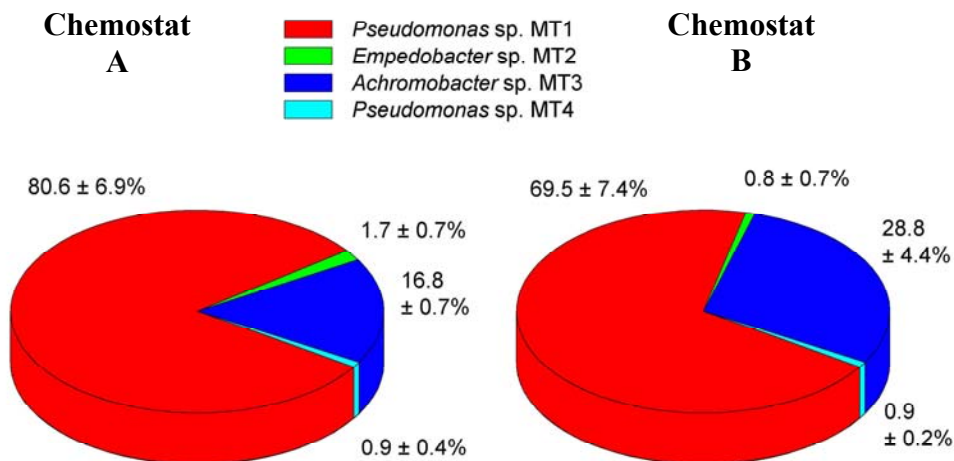


Abb. 3.17: Prozentuale Zusammensetzung der Stämme MT1 – 4 in den Chemostaten A und B zum Zeitpunkt des  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiments. *Pseudomonas* sp. MT1 ist in beiden Chemostaten mit Anteilen von A:  $80.6 \pm 6.9\%$  und B:  $69.5 \pm 7.4\%$  dominant. *Achromobacter* sp. MT3 nahm  $16.8 \pm 0.7\%$  (A) bzw.  $28.8 \pm 4.4\%$  (B) ein. *Empedobacter* sp. MT2 und *Pseudomonas* sp. MT4 sind in der Kultur lediglich zu 1 – 2 % enthalten.

Beide Chemostaten wuchsen über fünf Wochen in kontinuierlicher Kultur mit derselben Verdünnungsrate und Zelldichte (Abb. 3.13). Der Stamm *Pseudomonas* sp. MT1 ist mit

Anteilen von  $80.6 \pm 6.9$  % in Chemostat A und  $69.5 \pm 7.4$  % in Chemostat B dominant, während *Achromobacter* sp. MT3 prozentuale Anteile von  $16.8 \pm 0.7$  % in Chemostat A und  $28.8 \pm 4.4$  % in Chemostat B ausmachte. Die Stämme *Empedobacter* sp. MT2 und *Pseudomonas* sp. MT4 stellten in beiden Chemostaten mit 1 bis 2 % den geringsten Anteil.

Über die DAPI-Zellzahl, die nur DNA-haltige Zellen und damit keine leeren Zellhüllen detektiert, wurde direkt vor der  $^{13}\text{C}$ -Markierung eine Gesamt-Zelldichte von  $4.6 \pm 1.8 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  ( $n = 12$ ) in Chemostat A und  $4.0 \pm 1.2 \times 10^8$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  ( $n = 10$ ) in Chemostat B ermittelt.

### 3.5.2 Isotopenanreicherung der Biomasse und der Gesamt-RNA im Chemostaten-Konsortium nach Zugabe von $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$

Die im Chemostaten etablierten mikrobiellen Konsortien (Abb. 3.13) wurden für die Isotopenmarkierung mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  genutzt. Dafür wurde der bakteriellen Gemeinschaft in den Chemostaten A und B mit je 1 L Volumen ein Puls von 0.5 mg (Chemostat A) bzw. 1.0 mg (Chemostat B) vollmarkiertem  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  gegeben. Die 0 h-Probe wurde direkt vor der Markierung genommen, gefolgt von Probennahmen nach 15 min, 30 min, 1 h und 3 h sowie 24 h bei Chemostat B. In Abb. 3.18 sind die Isotopenwerte des Mediums, der Biomasse und der extrahierten Gesamt-RNA aus beiden Chemostaten in Abhängigkeit der Zeit nach der Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  dargestellt.

Im Chemostaten A erreichte die Biomasse nach 15 bis 30 min ihren höchsten  $^{13}\text{C}$ -Gehalt ( $\delta^{13}\text{C} = 320$  ‰), was auf eine schnelle Aufnahme des Substrats 4-Cl-Catechol hinweist. Der Isotopenwert blieb über 3 h mit  $\delta^{13}\text{C} = 291$  ‰ nahezu konstant. Die Isotopenwerte des Mediums zeigten einen identischen Verlauf, lagen aber unterhalb der Werte der Biomasse. In der Gesamt-RNA war eine langsamere Anreicherung zu erkennen, die nach 3 h ihren höchsten Wert bei  $\delta^{13}\text{C} = 42$  ‰ erreichte (Abb. 3.18, A).

Dem parallel betriebenen Chemostat B wurde die doppelte Menge an  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  injiziert, um eine stärkere Isotopenanreicherung in der rRNA zu erhalten. Dadurch konnten in Chemostat B höhere Isotopenwerte in der bakteriellen Biomasse ( $\delta^{13}\text{C} = 1250$  ‰ nach 1 h) und in der RNA gemessen werden (nach 1 h  $\delta^{13}\text{C} = 30$  ‰, nach 24 h  $\delta^{13}\text{C} = 360$  ‰). Im Medium wurde direkt nach der Substratzugabe ein Isotopenwert von  $\delta^{13}\text{C} = 1800$  ‰ erreicht, der nach 24 h auf  $\delta^{13}\text{C} = 370$  ‰ abgesunken war. Die Bakterien nahmen wie in Chemostat A das Substrat schnell auf und es kam zu einer langsamen Anreicherung mit  $^{13}\text{C}$  in der Gesamt-RNA (Abb. 3.18, B).

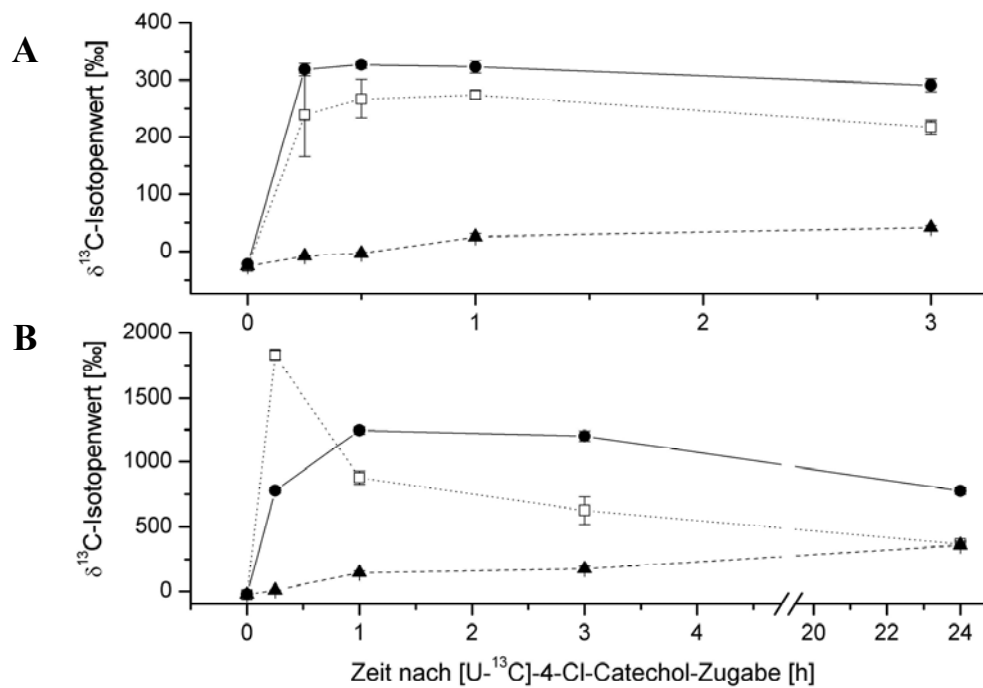


Abb. 3.18: Anreicherung von  $^{13}\text{C}$  im Medium (□), in der Biomasse (●) und der Gesamt-RNA (▲) der mikrobiellen Gemeinschaft der Chemostaten A und B nach Zugabe von 0.5 (A) bzw. 1.0 mg (B) [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol.

Die Fraktionierungsfaktoren innerhalb des mikrobiellen Konsortiums in Chemostat A und B zwischen der Biomasse und Gesamt-RNA sind in Abb. 3.19 über den Zeitraum der Experimente nach Zugabe von 0.5 mg (Chemostat A) und 1 mg (Chemostat B) [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol dargestellt.

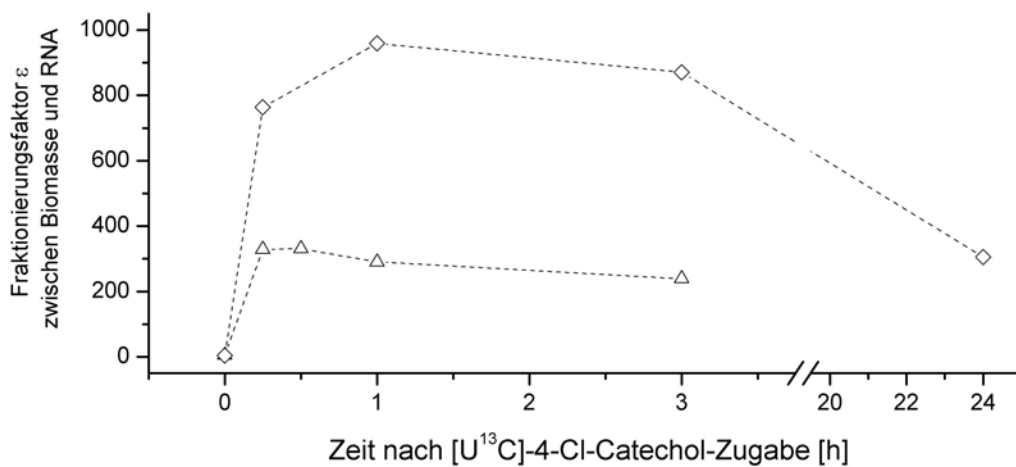


Abb. 3.19: Fraktionierungsfaktoren  $\epsilon$  zwischen Biomasse und Gesamt-RNA der mikrobiellen Konsortien in Chemostat A (Δ) und B (◇) nach Zugabe von [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol.

Wie bei den bakteriellen Reinkulturen (Tab. 3.7) ist in der mikrobiellen Gemeinschaft der Fraktionierungsfaktor  $\epsilon$  zwischen Biomasse und RNA nach der Zugabe einer größeren Menge von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat in Chemostat B gegenüber Chemostat A höher (Abb. 3.19). Über die Zeit nimmt die Fraktionierung in beiden Fällen ab, was eine langsame Annäherung des Isotopenwerts der RNA an den Wert der Biomasse anzeigt.

### 3.5.3 Isotopenanreicherung in den Fettsäuren und Aminosäuren

Die Analyse der Phospholipid-Fettsäuren (PL-FA) wurde bereits von Pelz und Mitarbeitern (1999) nach Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten zur Isotopenanalyse im Chemostatenkonsortium genutzt. In anderen Studien war es möglich, anhand der Isotopenmarkierung in den Phospholipid-Fettsäuren Rückschlüsse auf die am Substratabbau beteiligten phylogenetischen Gruppen zu ziehen (Boschker *et al.*, 1999).

Mit Hilfe der gaschromatographischen Auftrennung wurde die prozentuale Verteilung der Phospholipid-Fettsäuren der vier Stämme, welche in Batchkulturen im EM-Medium angezogen wurden (Kap.2.4.1), im mikrobiellen Konsortium der Chemostaten bestimmt (Tab. 3.9). Die Abkürzungen der Fettsäuren sind in Kap. 2.10.1.4 erläutert.

Tab. 3.9: Prozentuale Zusammensetzung der Phospholipid-Fettsäuren (Fläche in %) der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, *Empedobacter* sp. MT2, *Achromobacter* sp. MT3 sowie der Mischkulturen in Chemostat A und B zum Zeitpunkt des Markierungs-Experiments (Mittelwert aus 10 bis 14 Messungen mit Standardabweichung).

Phospholipid-Fettsäure	MT1 [%]	MT2 [%]	MT3 [%]	MT4 [%]	Chemostat A [%]	Chemostat B [%]
C14:0	-	3.4	-	-	-	-
C15:0i	-	30.5	-	-	-	-
C16:1 $\omega$ 7c	-	25.0	-	-	-	-
C16:1 $\omega$ 7t	-	14.6	-	-	-	-
C16:0	55.1	15.5	51.4	41.4	42.6 $\pm$ 5.5	52.6 $\pm$ 4.6
C17:1 $\omega$ 7ic	-	11.0	-	-	-	-
C17:0 d7,8cy	25.0	-	28.8	32.1	30.2 $\pm$ 4.0	25.8 $\pm$ 5.3
C18:1 $\omega$ 9	18.2	-	17.5	8.9	18.2 $\pm$ 3.0	14.0 $\pm$ 3.2
C18:0	1.1	-	1.8	2.8	4.9 $\pm$ 1.2	4.4 $\pm$ 2.7
C19:0 d8,9cy	0.6	-	0.5	12.4	4.2 $\pm$ 1.8	3.2 $\pm$ 1.4
C20:1 $\omega$ 9	-	-	-	2.4	-	-

Anhand der synthetisierten Phospholipid-Fettsäuren (PL-FA) ließen sich die Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 nicht differenzieren und *Pseudomonas* sp. MT4 synthetisierte zu 2.4 % die Eicosensäure C20:1 $\omega$ 9, welche in den anderen Stämmen nicht gemessen wurde (Tab. 3.9). Unterschiede zwischen den PL-FA der drei Stämme waren mit dieser Ausnahme lediglich prozentual. Das Fettsäuremuster des Stammes *Empedobacter*

sp. MT2 unterschied sich dagegen stark von den übrigen Stämmen, wobei MT2 vor allem kurzkettige Fettsäuren wie C15:0i und C16:1 $\omega$ 7 synthetisierte.

Die PL-FA, welche charakteristisch für die Stämme MT4 und MT2 waren, konnten in den Chemostatenkonsortien aber wegen des geringen prozentualen Anteils der beiden Stämme (Abb. 3.7) nicht detektiert werden. Eine Differenz der PL-FA in den Chemostaten gegenüber den Reinkulturen MT1 und MT3, deren Bakterien 98 % der mikrobiellen Gemeinschaft im Chemostaten ausmachten (Kap. 3.5.1), war lediglich quantitativ im prozentualen Vorkommen der Fettsäuren. Diese Unterscheidung war wahrscheinlich durch das unterschiedliche Medium und das Substratangebot in der Batch-Kultur gegenüber der Chemostaten-Kultur bedingt.

Durch die Extraktion der Fettsäuren und Aminosäuren aus dem Chemostaten-Konsortium (Kap. 2.10) und anschließende Isotopenanalyse (Kap. 2.12) wurde der aktive Einbau des stabilen Isotops in die Biomoleküle bestätigt und sichergestellt, dass es sich nicht nur um eine passive Aufnahme des markierten Kohlenstoffs in die Zellen handelte (Abb. 3.20).

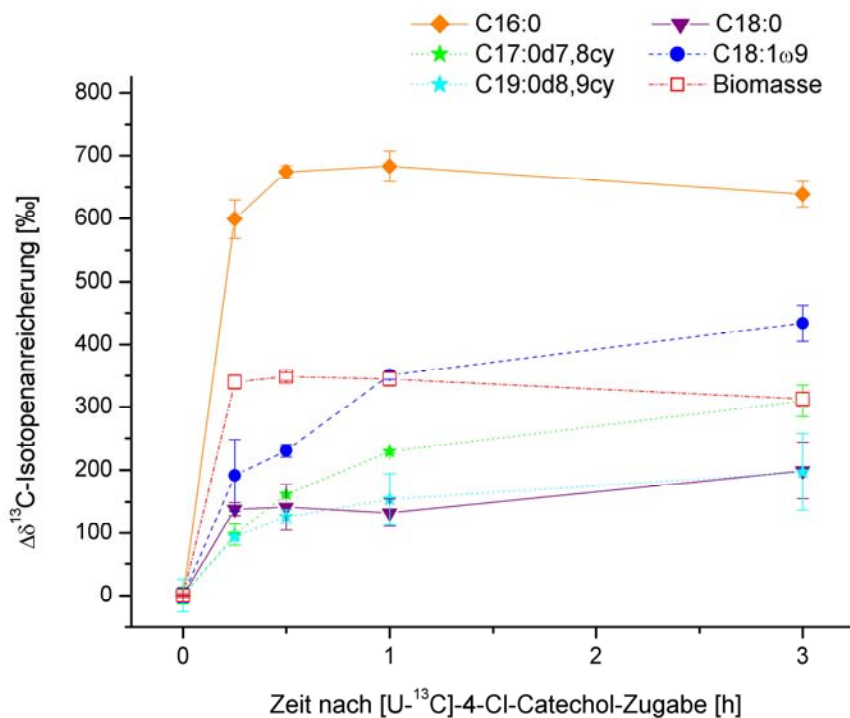


Abb. 3.20: Isotopenanreicherung der Fettsäuren der Phospholipide (PL-FA) des mikrobiellen Konsortiums in Chemostat A gegenüber der unmarkierten Probe sowie die der gesamten Biomasse nach Zugabe von 0.5 mg [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol. Die Anreicherungen wurden in allen Fettsäuren der Phospholipide gemessen. Der höchste  $\Delta\delta^{13}\text{C}$ -Wert von 680 ‰ zeigte sich in der Palmitinsäure C16:0 eine Stunde nach der Substratzugabe.

Die Isotopenanreicherung der PL-FA des mikrobiellen Konsortiums von Chemostat A sowie der Biomasse war gegenüber der unmarkierten Probe in der Palmitinsäure C16:0 mit  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 680 \text{ ‰}$  1 h nach Zugabe von 0.5 mg vollmarkiertem [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol am höchsten

(Abb. 3.20). Die geringsten Anreicherungen wurde mit  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 200 \text{ ‰}$  in den langkettigen Fettsäuren C18:0 und C19:0d7,8 gemessen. Die Biomasse beschrieb mit einer Anreicherung von maximal  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 350 \text{ ‰}$  einen mittleren Wert zwischen den Fettsäuren.

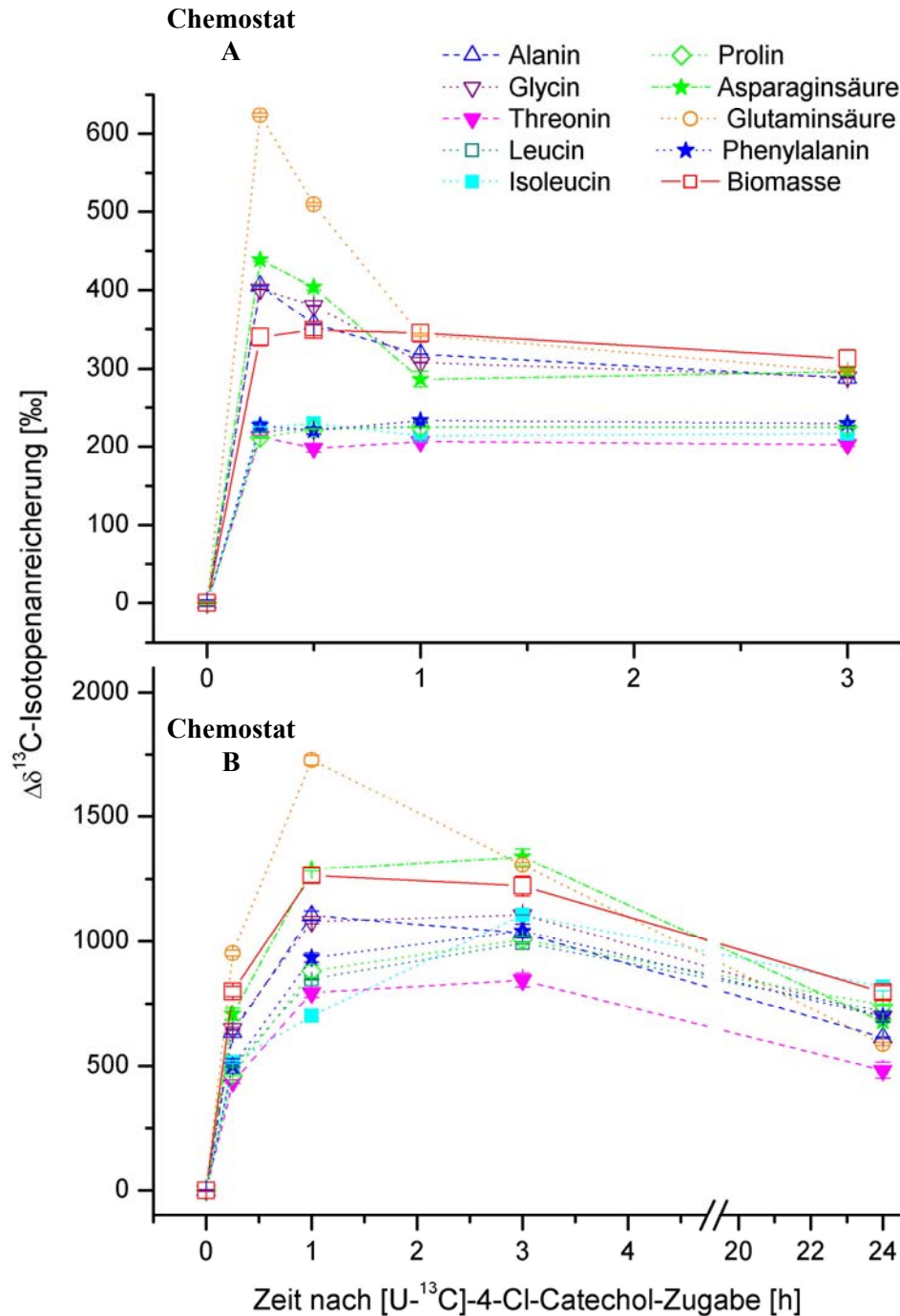


Abb. 3.21: Isotopenanreicherung in den einzelnen Aminosäuren und der gesamten Biomasse von Chemostat A und B nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-markiertem 4-Cl-Catechol gegenüber der unmarkierten Probe (0 h). Die Kurven sollten hier nicht einzeln betrachtet werden, sondern die Anreicherung in allen Aminosäuren als Kurvenschar gezeigt werden.



Die Isotopenwerte der parallel zu den PL-FA extrahierten Aminosäuren aus den Chemostaten A und B nach der Zugabe von  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol wurden ebenso gemessen und sind in Abb. 3.21 graphisch dargestellt. Hier sollte die Aufmerksamkeit nicht auf einzelne Aminosäuren, sondern auf die Anreicherung mit dem schweren Isotop in allen Molekülen gerichtet werden.

In beiden Chemostaten wurden in allen Aminosäuren Anreicherungen von  $\Delta\delta^{13}C = 200 \text{ ‰}$  bis  $\Delta\delta^{13}C = 600 \text{ ‰}$  (Abb. 3.21, Chemostat A) und  $\Delta\delta^{13}C = 800 \text{ ‰}$  bis  $\Delta\delta^{13}C = 1700 \text{ ‰}$  (Abb. 3.21, Chemostat B) mit dem stabilen Isotop gemessen. Durch den Einbau des Isotops in diese Biomoleküle zusammen mit den Isotopenwerten der Phospholipid-Fettsäuren wurde die Metabolisierung des chlorierten Substrats 4-Cl-Catechol durch die Bakterien des Chemostaten-Konsortiums bestätigt.

### **3.5.4 Isotopenanreicherung in der 23S-rRNA der Hauptvertreter des Chemostaten-Konsortiums nach Zugabe von $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol**

Zu der mikrobiellen Gemeinschaft in Chemostat A wurde wie in Kap. 3.5.2 beschrieben 0.5 mg  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol gegeben. Nach der Separation der 23S-rRNA durch Hybridisierung mit den Sonden Gam 42a und Bet 42a gegen Gamma- und Beta-proteobakterien war keine Veränderung im Isotopenwert in Abhängigkeit der Zeit sichtbar (Abb. 3.22, A).

Im Chemostat B wurde die doppelte Menge an  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol verwendet. Die Gesamt-RNA der Bakterien aus dem Chemostat B besaß dadurch eine deutlich höhere prozentuale Anreicherung gegenüber der aus dem Chemostaten A (Abb. 3.18, B und Abb. 3.22, B). Die Isotopenwerte der für die Hybridisierung eingesetzten Gesamt-RNA lagen in Chemostat B 1 h nach Zugabe von  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol bei  $\delta^{13}C = +145 \text{ ‰}$  und erhöhten sich nach 24 h um 225 ‰ auf  $\delta^{13}C = +360 \text{ ‰}$  gegen PDB. Diese hohen Anreicherungen wurden in der rRNA nicht gemessen. Dennoch war nach der Separation der 23S-rRNA mit Hilfe der Gam 42a- und Bet 42a-Sonden eine  $^{13}C$ -Markierung sichtbar (Abb. 3.22, B). Die Isotopenwerte der 23S-rRNA von *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4 waren bereits 1 h nach der Markierung mit  $\Delta\delta^{13}C = +11.7 \text{ ‰}$  signifikant erhöht gegenüber der Probe vor der Markierung, die der rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 mit  $\Delta\delta^{13}C = +18.8 \text{ ‰}$  nach 24 h (Abb. 3.22, B). Nach Zugabe von  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol bauten die Gammaproteobakterien, welche im Chemostaten zu 98.8 % zu *Pseudomonas* sp. MT1 und lediglich zu 1.2 % zu *Pseudomonas* sp. MT4 gehörten (Kap. 3.5.1), über den gemessenen Zeitraum das stabile Isotop  $^{13}C$  aus 4-Cl-Catechol schneller und mit höherem Prozentsatz in seine 23-rRNA-Moleküle ein als die Betaproteobakterien *Achromobacter* sp. MT3.

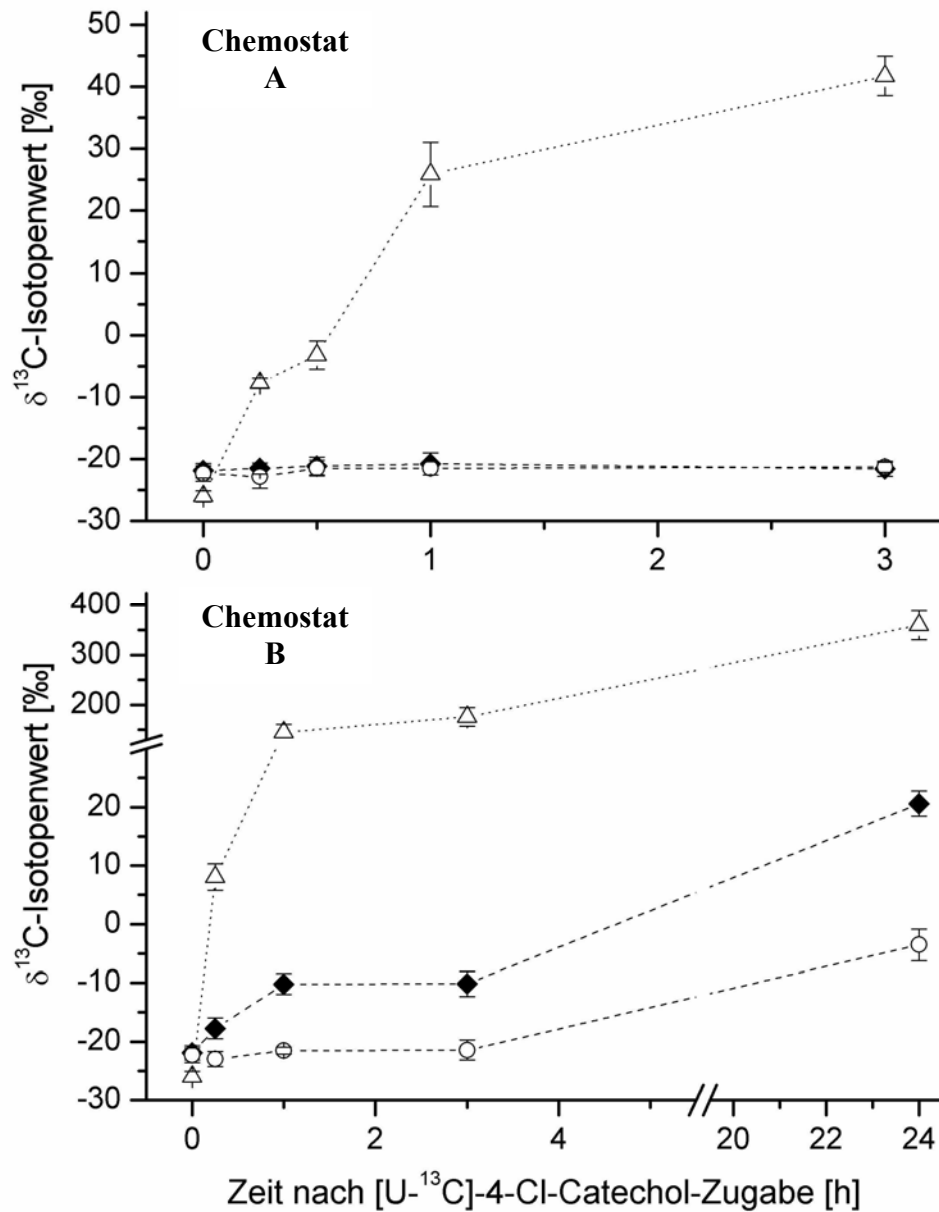


Abb. 3.22: Isotopenwerte der Gesamt-RNA ( $\Delta$ ) und der 23S-rRNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 ( $\blacklozenge$ ) und *Achromobacter* sp. MT3 ( $\circ$ ) in Chemostat A und B. Bereits nach 15 min nach [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol-Zugabe war eine deutliche  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der Gesamt-RNA beider Chemostaten messbar. Im Chemostaten A war nach der Abtrennung der 23S-rRNA keine Veränderung in Abhängigkeit der Zeit sichtbar. In Chemostat B war 1 h nach Zugabe der doppelten Menge an [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol eine signifikante  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der separierten 23S-rRNA von *Pseudomonas* sp. MT1 messbar, in der rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 nach 24 h.

### 3.6 Mikrobielle Biofilme auf polychlorierten Biphenylen (PCB)

Der hier beschriebene Biofilm ist im Gegensatz zum bereits beschriebenen Chemostaten ein offenes und komplexes System, zusammengesetzt aus verschiedenen, zunächst unbekannten Mikroorganismen. Wie im Chemostaten wurde als die einzige Kohlenstoff- und Energiequelle ein Substrat eingesetzt, hier ein Gemisch aus polychlorierten Biphenylen (PCBs), welches nur von einzelnen Spezialisten bzw. einer speziellen Gemeinschaft von Mikroorganismen initial metabolisiert werden kann.

Der Boden, der als Inokulum für die folgenden Biofilme genutzt wurde, stammte von der Deponie eines ehemaligen Raketenstützpunktes der Westgruppe der sowjetischen Armee im Raum Wittenberg in Sachsen-Anhalt. Dieser Standort wurde durch auslaufende Kondensatoren stark mit polychlorierten Biphenylen verunreinigt. Der in dieser Arbeit genutzte Boden wies eine Kontamination an PCBs von bis zu  $13.5 \text{ g kg}^{-1}$  Boden auf (Boden 7, Abraham *et al.*, 2003). Neben wenig Penta- und Hexachlor-Kongeneren wurden überwiegend tri- und tetrachlorierte Kongenere nachgewiesen (Nogales *et al.*, 1999). Diese Zusammensetzung und die relativen Anteile der einzelnen Kongenere entsprachen, bis auf das Fehlen von einfach und doppelt chlorierten Biphenylen, der PCB-Mischung Trichlor-diphenyl, die mit der technischen PCB-Mischung Arochlor 1242 übereinstimmt (Ivanov und Sandell, 1992). Arochlor 1242 wurde daher in den folgenden Experimenten als Substrat zum Aufwuchs von Biofilmen eingesetzt.

Von zentraler Bedeutung war die Frage, wie es dem Biofilm-Konsortium gelingt, auf den hochkonzentrierten PCBs zu wachsen und welche Organismengruppen in der mikrobiellen Gemeinschaft des Bodens das PCB abbauen können. Obwohl viele Stämme aus PCB-kontaminierten Habitaten isoliert werden konnten (Fedi *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 1997), waren die meisten nicht in der Lage, das Substrat vollständig zu mineralisieren. Aus vorangegangenen Versuchen mit ähnlichen auf PCB aufgewachsenen Biofilmen (Abraham *et al.*, 2002) und direkt aus dem verwendeten mit PCB kontaminierten Boden standen zum Vergleich mit den gesamten Biofilmen bakterielle Isolate zur Verfügung (siehe 2.4.4), die allerdings als Reinkultur lediglich eine geringe Zahl niedrigchlorierter Kongenere abbauen konnten (Abraham *et al.*, 2003).

Zusätzlich zum Wachstum des Biofilms (Kap. 3.6.1) wurde die PCB-Zusammensetzung ermittelt und so die prozentuale Abnahme der einzelnen Kongenere verfolgt (Kap. 3.6.4). Eine molekularbiologische Charakterisierung des Biofilms erfolgte durch die Fingerprint-Methode SSCP, für die Gesamt-RNA extrahiert, die 16S-rRNA in cDNA transkribiert und einzelne Stämme mittels 16S-rDNA-Sequenzanalyse identifiziert wurden (Kap. 3.6.3). Abschließend wurde nach der  $^{13}\text{C}$ -Markierung eines PCB-Kongeners die Verbindung der

phylogenetischen Informationen von Biomarker-Molekülen aus dem Biofilm und der Aufnahme des schweren Isotops analysiert (Kap. 3.7).

### 3.6.1 Entwicklung und Struktur der auf PCB gewachsenen Biofilme

Zur strukturellen Entwicklung der auf PCB gewachsenen Biofilme wurden diese mikroskopisch untersucht. In Abb. 3.24 wird ein Ausschnitt der Aufwuchsträger dargestellt direkt nach der Beschichtung mit PCB im Vergleich zu dem Träger nach 3-wöchiger Inkubation in Wasser, durch das Mikroorganismen aus dem PCB-belasteten Boden zu den Trägern gelangen konnten. An den Rändern der PCB-Tropfen hat sich nach 3 Wochen ein dünner Biofilm gebildet (Abb. 3.23).

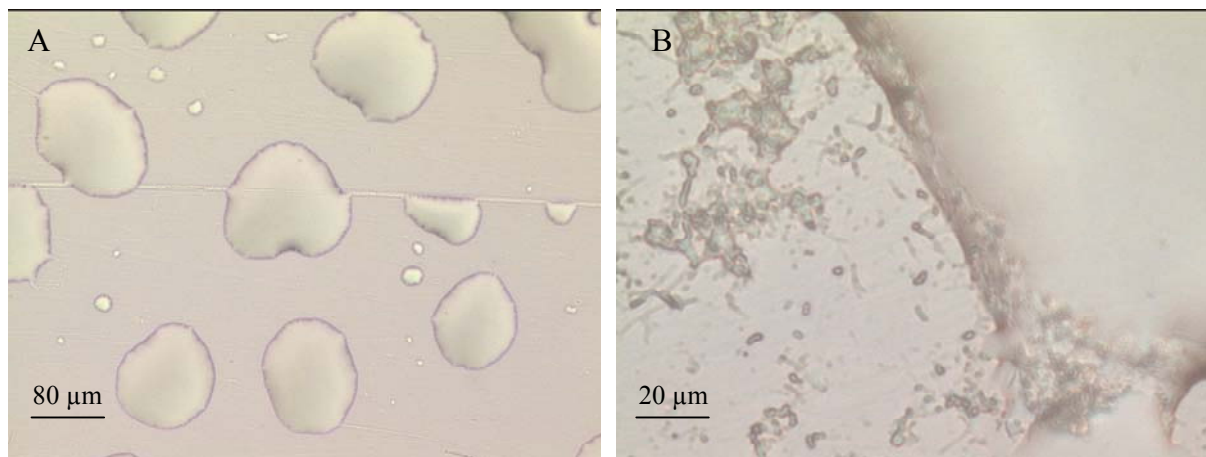


Abb. 3.23: Permanoxträger direkt nach der PCB-Beschichtung (A) und nach 3 Wochen (B). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden im Hellfeld bei 100- und 400-facher Vergrößerung aufgenommen und zeigen die Bildung eines Biofilms nach 3-wöchiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

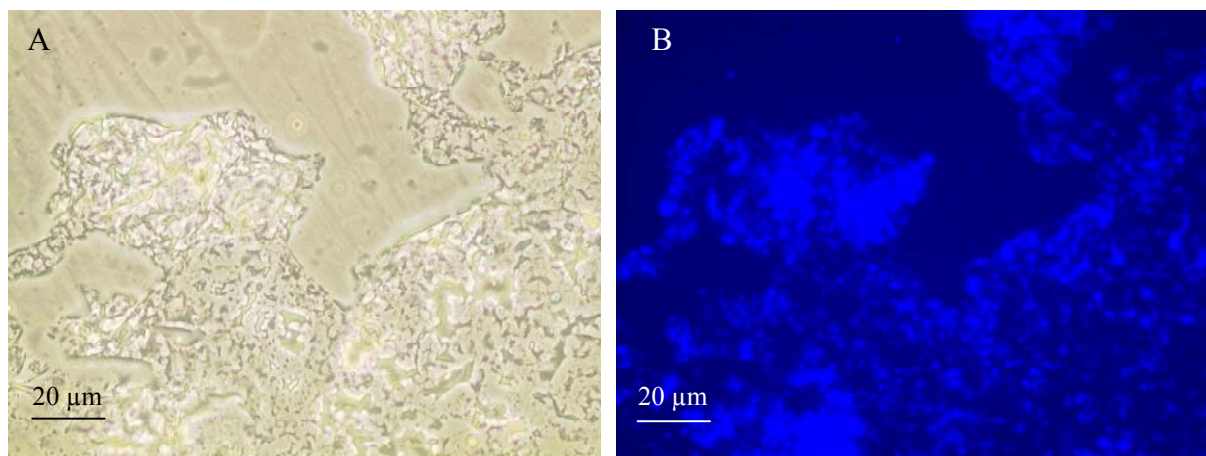


Abb. 3.24: Mikroskopische Aufnahme des PCB-Biofilms nach 4 Monaten Wachstum im Hellfeld (A) und mit DAPI-Filter (B) bei 400-facher Vergrößerung.

In den Abbildungen 3.23 und 3.24 sind mikroskopische Aufnahmen der PCB-Tropfen direkt nach der Beschichtung eines Trägers, nach dreiwöchiger und viermonatiger Inkubation mit PCB-belastetem Boden zu sehen. Die PCB-Tropfen wiesen einen Durchmesser von 80 bis 100  $\mu\text{m}$  auf, an deren Rändern bereits nach drei Wochen eine mikrobielle Besiedlung sichtbar war. Das PCB wurde zunehmend von einem Biofilm bewachsen (Abb. 3.24). Die Bereiche zwischen den PCB-Tropfen blieben unbewachsen, was einen Hinweis darauf gab, dass das PCB das primäre Substrat für den Biofilm stellt.

Um ausreichend bakterielle Biomasse für eine nachfolgende Extraktion der RNA und der Fettsäuren zu erhalten, war die Dichte des Biofilms von besonderer Bedeutung. Zur Abschätzung der Zellzahl eines Trägers nach 4 Monaten Wachstum wurden mit dem DNA-Farbstoff DAPI markierte Zellen auf einer Fläche von 12.5  $\mu\text{m}$  x 12.5  $\mu\text{m}$  bei 1000-facher Vergrößerung ausgezählt und so eine ungefähre Zelldichte von  $2.0 \pm 0.3 \times 10^8$  Zellen (siehe Kap. 2.4.4) pro PCB-beschichteter Trägerseite ermittelt.

Für das  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment (Kap. 3.7) wurden weitere Träger mit Arochlor 1242, das einen geringen Anteil (1:1650) an vollmarkiertem  $^{13}\text{C}$ -2,2'-Dichlorobiphenyl enthielt, beschichtet und nach 5 Wochen Wachstum mikroskopiert. Die folgenden Aufnahmen (Abb. 3.25) zeigen den Biofilm im Hellfeld und mit DAPI-Filter bei 400- und 1000-facher Vergrößerung.

Nach 5 Wochen Wachstum auf Trägern mit  $^{13}\text{C}$ -markierten und unmarkierten PCB waren noch unbesiedelte Bereiche erkennbar (Abb. 3.25). Dichtere Biofilme bildeten sich in direkter Nachbarschaft von zum Teil mikroskopisch sichtbaren PCB-Tropfen (grüne Pfeile), welche noch nicht besiedelt waren. In der Struktur der Biofilme befanden sich aufgewirbelte Bodenpartikel (rote Pfeile). Eine Abschätzung der Zellzahl (Kap. 2.4.4) war durch die inhomogene Verteilung der Mikroorganismen schwierig. Insgesamt wurden weniger Zellen als im 4 Monate alten Biofilm detektiert. Das Wachstum der Biofilme auf den Permanoxträgern erfolgte nur langsam und lediglich in den mit PCB-beschichteten Bereichen.

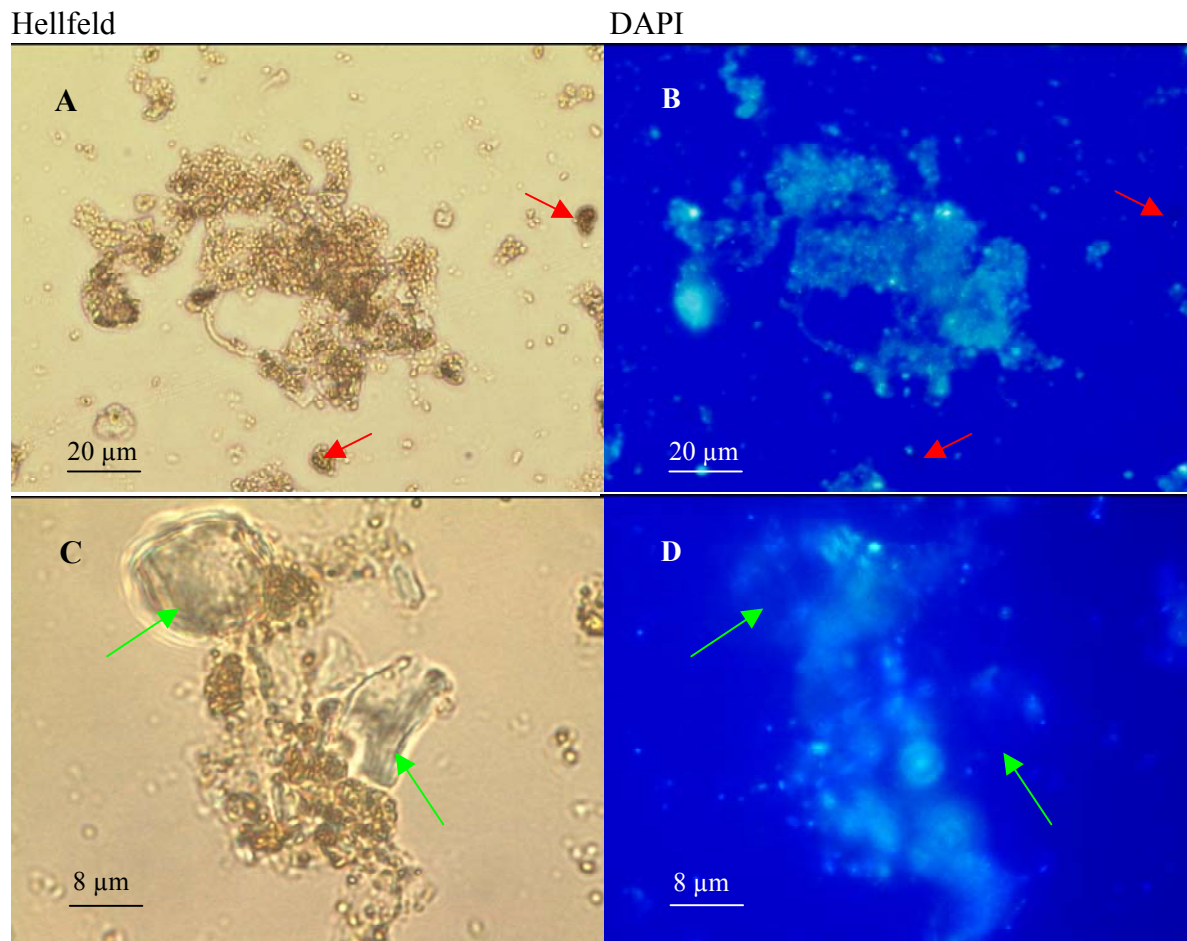


Abb. 3.25: Mikroskopische Aufnahmen eines fünf Wochen alten Biofilms auf Arochlor 1242 und  $^{13}\text{C}$ -2,2'-Dichlorobiphenyl. Ausschnitte des Permanox-Trägers bei 400-facher Vergrößerung (A und B) und bei 1000-facher Vergrößerung (C und D), im Hellfeld (A und C) und mit DAPI-Filter (B und D). In den Biofilm sind Bodenpartikel eingebunden (rote Pfeile), die durch die Rotationsbewegung der Wanne aufgewirbelt wurden. Die grünen Pfeile zeigen noch unbesiedelte PCB-Tropfen.

### 3.6.2 RNA-Extraktion aus PCB-Biofilmen

Die Extraktion der Ribonukleinsäuren wurde aus PCB-Biofilmen ohne  $^{13}\text{C}$ -Markierung von jeweils 6 bis maximal 11 beidseitig beschichteten Trägern mit verschiedenen Methoden (Kap. 2.6.1) durchgeführt und 1/3 der extrahierten RNA auf ein Agarosegel aufgetragen, ohne dass nach einer Ethidiumbromid-Färbung Banden sichtbar waren. Vorkommen von RNAsen konnten durch parallel aufgetragene RNA-Proben ausgeschlossen werden. In vorangegangenen Experimenten mit definierten Mengen an *E.coli* 23S- und 16S-rRNA wurden noch Mengen von etwa 50 ng rRNA auf dem Gel detektiert. Es wurde demnach eine geringere Menge als 150 ng (3 x 50 ng) rRNA aus den PCB-Biofilmen extrahiert.

Um die Ursachen für die unzureichende RNA-Extraktion zu ermitteln, wurden aus dem Biofilm isolierte Bakterien, die als Reinkulturen in Vollmedium gewachsen waren, nach der Ernte mit polychlorierten Biphenylen gemischt und anschließend die RNA extrahiert. Diese

Extraktion ergab keine geringere RNA-Menge als in der Kontrollextraktion mit der gleichen Anzahl an Zellen ohne PCB. Ein störender Einfluss der PCBs auf die Extraktionsmethode konnte also als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Wurden dagegen zu den gleichen Zellen eine ähnliche Anzahl Bakterien aus einem PCB-Biofilm gegeben, wurde nach der Extraktion keine signifikant höhere RNA-Menge detektiert. Mehrfaches Waschen der Zellen vor der Extraktion mit Hexan zur Ablösung von PCB ergab weder eine Verringerung der extrahierten RNA-Menge bei den Reinkulturen noch eine Verbesserung bei der Extraktion der Zellen aus dem PCB-Biofilm.

Für die enzymatische Transkription in cDNA und die Vervielfältigung in einer PCR-Reaktion (für die SSCP-Analyse, siehe 3.8.3) wurde genug rRNA aus dem Biofilm extrahiert. Für Hybridisierungsversuche mit an paramagnetische Partikel gekoppelten Sonden und einer anschließenden Isotopenmessung am Elementaranalysator wie im Chemostaten-Konsortium (Kap. 3.5.4) war die zur Verfügung stehende RNA-Menge jedoch nicht ausreichend.

### **3.6.3 SSCP-Fingerabdruck-Analysen der Biofilm-Gemeinschaft**

Zur Ermittlung der Diversität sowie der phylogenetischen Analyse der Stämme in der mikrobiellen Gemeinschaft des Biofilms wurde die Methode Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP, Schwieger und Tebbe, 1998) eingesetzt. Hierfür wurden die Nukleinsäuren extrahiert und die aus der rRNA transkribierte cDNA des gesamten bakteriellen Konsortiums in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Das Produkt mit je 370 Basenpaaren aus der 16S-rRNA wurde semikonservativ verdaut und die nun einzelsträngige DNA mit ihrer durch die Basenfolge charakteristischen Faltung in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Kap. 2.9.2).

Für das in Abb. 3.26 gezeigte SSCP-Gel wurde die Gesamt-RNA aus fünf Wochen alten Biofilmen extrahiert (Kap. 2.6.1.3). Sie stammte aus Biofilmen von PCB-beschichteten Trägern (A - D) sowie aus Biofilmen des gleichen Ansatzes, die keinen direkten PCB-Kontakt hatten (E - I), vom Wannenrand (F, I) bzw. vom nicht mit PCB-beschichteten Rand der Permanoxträger (E und G - H). Durch die gelelektrophoretische Auftrennung waren mehr als 20 Banden sowohl im direkten Kontakt mit PCB (+PCB) als auch indirekt (-PCB) identifizierbar, wobei einige der Banden in dem auf PCB gewachsenen Biofilm stark angereichert waren (Abb. 3.26).



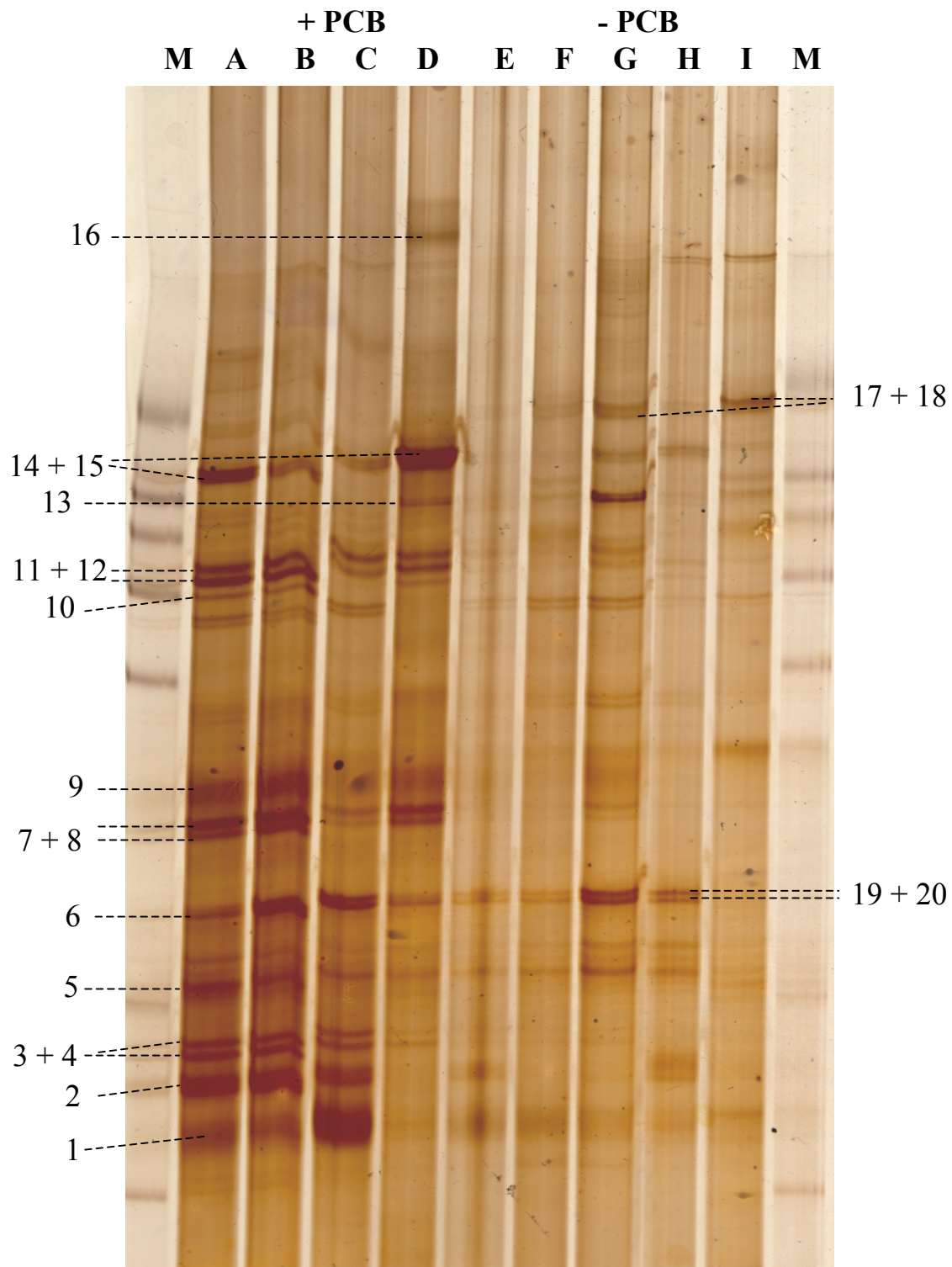


Abb. 3.26: SSCP-Gel des zentralen Bereichs (*E. coli*: 519 - 926) der 16S-rRNA eines fünf Wochen alten Biofilms auf PCB (Spalte A - D) bzw. ohne direkten PCB-Kontakt (E - I) im gleichem Ansatz (M = Marker). Die Nummerierung 1 - 20 zeigt die anschließend ausgeschnittenen und sequenzierten Banden.

Die in Abb. 3.26 markierten Banden 1 - 20 wurden ausgeschnitten und konnten nach einer weiteren PCR sequenziert werden. Durch den Vergleich mit der Datenbank des NCBI (N-



BLAST-Search, Stand Nov. 2002; Altschul *et al.*, 1997) wurden die nächsten beschriebenen Sequenzen ermittelt (Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Ähnlichste Sequenzen der NCBI-Datenbank zu den sequenzierten Banden aus dem in Abb. 3.25 gezeigten SSCP-Gel. Die Banden Nr. 1 - 16 stammten aus Biofilmen mit PCB, Banden Nr. 17 - 20 aus Biofilmen ohne direkten Kontakt mit PCB.

Bande Nr.	ähnlichste Sequenz (N-BLAST) mit Identifizierungs-Nr.	phylogenetische Gruppe	Ähnlichkeit
1	unkultiviertes <i>Pietermaritzburg</i> Bakterium (aus BTX-abbauender Gemeinschaft in Sand) AF312220	Planctomycetes	95 %
2	unkultiviertes Bodenbakterium (Arizona) AF507714 bzw. <i>Burkholderia</i> sp. AB101 AF219126	beta-Proteobakterium	beide: 86 %
3	<i>Planctomyces</i> sp. X81950	Planctomycetes	83 %
4	Bodenbakterium X64383	Planctomycetes	95 %
5	unkultiviertes Bakterium (Antarktis) AF424411	<i>Firmicutes</i>	86 %
6	<i>Eubacterium halii</i> L34621	Clostridia, Firmicutes	88 %
7 + 8	<i>Afipia massiliensis</i> AY029562	alpha-Proteobakterium, Bradyrhizobiaceae	100 %
9	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AY430822	alpha-Proteobakterium Bradyrhizobiaceae	94 %
10	<i>Methylobacterium</i> sp. AF361189	alpha-Proteobakterium	97 %
11	<i>Methylobacterium</i> sp. Z23156	alpha-Proteobakterium	97 %
12	<i>Methylobacterium</i> sp. X89908	alpha-Proteobakterium	94 %
13	<i>Methylobacterium</i> sp. D32233	alpha-Proteobakterium	89 %
14 + 15	unkultiviertes Bodenbakterium AF525829 bzw. <i>Aquabacterium</i> sp. (Trinkwasserbiofilm) AF08958	beta-Proteobakterium	100 %
16	unkultiviertes Bakterium (Klon aus Thailand) AJ319572	beta-Proteobakterium	99 %
17	unkultiviertes Bakterium (Rhizosphere) AJ431308	beta-Proteobakterium	98 %
18	unkultiviertes Bakterium AJ431298	beta-Proteobakterium	98 %
19	<i>Spirosoma-like</i> sp. (aus Biofilm einer Klimaanlage) X89919	Phylum <i>Bacteroidetes</i> <i>Flexibacteraceae</i> , <i>Sphingobacteria</i>	92 %
20	unkultiviertes Bakterium (aus heißer Quelle, Yellowstone Park) AF445698	Phylum <i>Bacteroidetes</i>	91 %

Die sequenzierten Banden aus dem SSCP-Gel der rRNA des PCB-Biofilms gehörten zu 45 % zu bislang unkultivierten Bakterien. Insgesamt wurden vor allem Vertreter der Gruppe der

Alphaproteobakterien (35 %) gefunden, in der die Methylobakterien (57 %) dominierten. 30 % aller identifizierten Banden gehörten zu Sequenzen, die unkultivierten Betaproteobakterien glichen, wobei eine Bande (Bande 2) als nächstes kultiviertes Bakterium der Sequenz eines Stamms der Gattung *Burkholderia* ähnelte. 15 % der Banden wurden Stämmen der Gattung *Planctomyces* und einige Sequenzen mit geringen Ähnlichkeiten (86 – 92 %) zu Gram-positiven Eubakterien sowie zwei unkultivierten Bakterien des *Bacteroidetes*-Phylum zugeordnet, welche ebenfalls aus einem Biofilm bzw. aus einer heißen Quelle isoliert wurden.

Die Sequenzen der nahe beieinander liegenden Banden 7 und 8 sowie 14 und 15 waren identisch. Die Identität der Basensequenz der Banden 17 und 18 betrug 98.2 %, die der Banden 19 und 20 betrug 96.6 %. Die Banden 1, 3 und 4 wurden ebenso untereinander verglichen, wiesen aber nur eine geringe Ähnlichkeit von 72 % bis 74 % Basenidentität auf; ebenso die Bandensequenz von 5 und 6 mit lediglich 68 % identischen Basen.

### **3.6.4 Veränderung des PCB-Gemisches durch mikrobielles Wachstum**

In den vorstehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass sich Bakterien auf bzw. am hochkonzentrierten PCB-Gemisches ansiedelten und Biofilme bildeten (Kap. 3.6.1 und 3.6.3). Weiterhin sollte die durch das mikrobielle Wachstum veränderte Zusammensetzung der Kongenere sowie die von der Biofilm-Gemeinschaft bevorzugten PCB-Substrate ermittelt werden. Dafür wurde das PCB-Gemisch gaschromatographisch aufgetrennt (Kap. 2.10) und die prozentuale Abnahme der Signalflächen der einzelnen Kongenere in Bezug auf das eingesetzte Arochlor 1242-PCB-Gemisch in Abhängigkeit der Zeit ermittelt.

Das für biologischen Abbau weitgehend inerte Kongener 2,2',5,5'-Tetrachloro-Biphenyl dient neben fünf weiteren Kongeneren zur Abschätzung gesamter PCB-Mengen in der Umwelt (Beck und Mathar, 1985) und wurde hier als interner Standard genutzt (Abb. 3.27). Bei der prozentualen Abnahme ist der Anteil der einzelnen Kongenere im Ausgangsgemisch (Signalfläche in %) wichtig für die Fehlerbetrachtung und Gewichtung der Abnahme, so dass diese Information in Abb. 3.27 graphisch dargestellt wurde. Zusätzlich zu der Kongeneren-Abnahme des <sup>13</sup>C-Markierungsversuchs während der fünf Wochen (Kap. 3.7) wurde die prozentuale Abnahme der Signalfläche durch rein chemisch-physikalische Einflüsse gemessen. Aufgrund der Beschichtung der Träger, des Abspülens und der Aufarbeitung vor der gaschromatographischen Auftrennung kam es zu Abnahmen der Signalfläche der niedrig chlorierten PCB-Kongenere (Abb. 3.27).

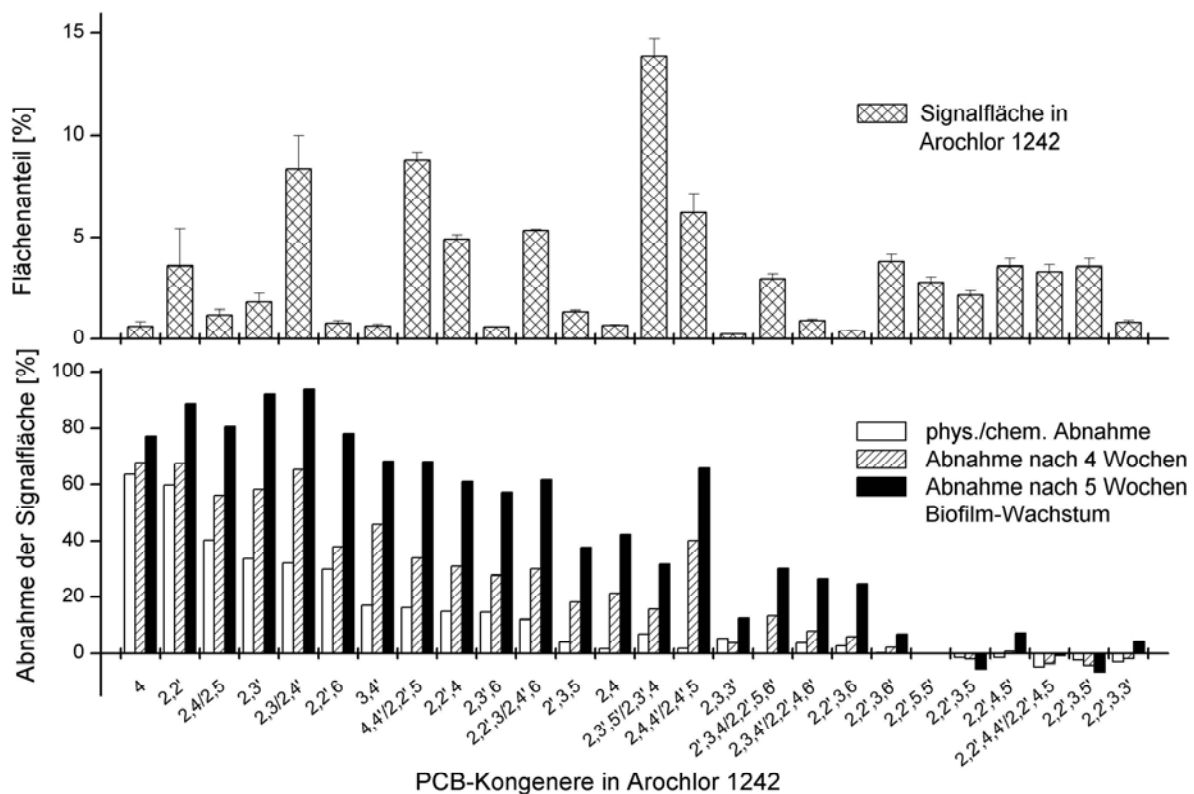


Abb. 3.27: Prozentuale Signalfäche der PCB-Kongenere von Arochlor 1242 (oben) und Abnahme der Signale während des 4- und 5-wöchigen Wachstums eines Biofilmes im Vergleich zu rein physikalisch, chemischen Effekten (unten) bezogen auf das Kongener 2,2',5,5' tetrachloro-Biphenyl. Die stärkste Abnahme erfolgte in den zwei- bis dreifach chlorierten PCB-Kongeneren, während die vierfach chlorierten PCBs kaum Abnahme in den Signalfächen zeigten.

Keiner der in Abb. 3.27 aufgeführten PCB-Kongenere wurde innerhalb der fünf Wochen Biofilmwachstum zu 100 % abgebaut. Eine starke Abnahme von mehr als 80 % war in den zweifach chlorierten PCBs 2,2'- bis 2,4'-Dichloro-Biphenyl nach fünf Wochen sichtbar. Das Signal der Kongenere 2,3- und 2,4'-Dichloro-Biphenyl, die gaschromatographisch nicht getrennt werden konnten und im Mittel einen Flächenanteil von 8.8 % ausmachten, nahm zu 94 % ab. Hier ist zu beachten, dass ein großer Teil der wenig chlorierten Biphenyle bereits durch physikalisch-chemische Einflüsse dezimiert wurde. So nahm 2,2'-Dichlorobiphenyl durch nicht biologische Einflüsse um 60 %, die Kongenere 2,4- und 2,5'-Dichlorobiphenyl um 40 % und 2,3'-Dichlorobiphenyl um 33 % ab. Bei allen folgenden Kongeneren war dieser Verlust geringer. Die Signalfäche der vierfach chlorierten PCBs durch chemisch-physikalischen und biologischen Abbau nahm innerhalb der fünf Wochen bis maximal 30 % ab. Die zum Teil negativen Werte der hochchlorierten Kongenere wurden wahrscheinlich durch eine geringfügige Abnahme des Kongeners 2,2',5,5'-Tetrachloro-Biphenyl bewirkt, dessen Flächeveränderung als interner Standard auf 0 gesetzt wurde. Der biologische Abbau einzelner Kongenere, insbesondere der zwei- und dreifach chlorierten PCBs, wurde gleichwohl deutlich (Abb. 3.27).

### 3.7 Markierung des PCB-Biofilms mit [U-<sup>13</sup>C]-2,2'-Dichlorobiphenyl

Durch der Zugabe von einem [U-<sup>13</sup>C]-PCB-Kongener zum PCB-Gemisch, auf dem neue Biofilme wuchsen, sollten am Abbau beteiligte Bakterien identifiziert werden. Dieser Ansatz sollte Aufschluss über die Umsetzung des Kohlenstoffs aus den chlorierten Biphenylen in den Zellen z.B. zur Biosynthese der Phospholipid-Fettsäuren geben, welche als Biomarker-Moleküle eingesetzt werden können.

Dafür wurden Permanoxträger mit dem Arochlor 1242-PCB-Gemisch mit einem geringen Anteil von [U-<sup>13</sup>C]-2,2'-Dichlorobiphenyl beschichtet. Das Verhältnis von <sup>13</sup>C:<sup>12</sup>C im PCB-Gemisch insgesamt betrug 1:1650, das von <sup>13</sup>C-2,2'-Dichlorobiphenyl zu unmarkiertem 2,2'-Dichlorobiphenyl 1:66. Der im GC-IRMS gemessene Isotopenwert dieses Kongeners lag vor der Markierung bei  $\delta^{13}\text{C} = -15\text{‰}$  gegenüber PDB und nach der Zugabe bei  $\delta^{13}\text{C} = +1900\text{‰}$ , während die anderen PCB-Kongeneren einen durchschnittlichen Isotopenwert von  $\delta^{13}\text{C} = -25\text{‰}$  beibehielten.

Die Bildung von Biofilmen auf dem teilweise [U-<sup>13</sup>C]-markierten PCB wurde über einen Zeitraum von 5 Wochen verfolgt (Kap. 3.7). Danach wurden 7 (Biofilm A) und 6 Permanoxträger (Biofilm B) direkt in die Lipid-Extraktion und für die Derivatisierung der Fettsäuren von Phospho- und Glykolipiden eingesetzt (Kap. 2.10.1). Nach der chromatographischen Auftrennung der Phospholipid-Fettsäuren der PCB-Biofilme wurden die einfach ungesättigten Fettsäuren C18:1 $\omega$ 7 und C17:1 $\omega$ 6 sowie die ubiquitäre Palmitinsäure C16:0 als wichtigste Fettsäuren detektiert (Tab. 3.11). Außerdem konnten die gesättigten Fettsäuren C14:0 und C18:0, die ungesättigten Fettsäuren C17:1 $\omega$ 6, C18:1 $\omega$ 9 und C20:1 $\omega$ 9 sowie geringe Mengen der zyklischen Fettsäure C19:0d7,8cy über die Retentionszeit und das Massenspektrum identifiziert werden. Bei den Glykolipiden wurden vorwiegend kurze gesättigte Fettsäuren wie C12:0, C14:0 und C16:0 extrahiert sowie C18:0 und C17:1 $\omega$ 6 (Tab. 3.11).

Parallel zu dem Biofilmwachstum auf teilweise [U-<sup>13</sup>C]-markierten PCB wurde das Wachstum von Biofilmen auf einzelnen Trägern mit unmarkiertem PCB verfolgt und eine Analyse der Fettsäuren der gesamten Lipide durchgeführt (MIDI-Verfahren, Kap. 2.10.1.3). Diese Extraktionsmethode hat den Vorteil, dass sie eine erheblich geringere Menge an Biomasse zur Fettsäureanalytik benötigt. Sie ermöglichte jedoch keine Abtrennung der hydrophoben PCBs von den Fettsäuren, so dass die methylierten Fettsäuren in der gaschromatographischen Auftrennung von den PCB-Kongeneren überlagert wurden und keine Isotopenanalyse erfolgen konnte. Eine Isotopenbestimmung der Fettsäuren von

Phospho- und Glykolipiden der PCB-Biofilme war daher nur nach der modifizierten Bligh-Dyer-Extraktion möglich (Kap. 2.10.1).

Tab. 3.11: Durchschnittliche Signalfächen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der Fettsäuren von Phospho- und Glykolipiden der mit  $^{13}\text{C}$ -2,2'-Dichlorobiphenyl markierten PCB-Biofilme nach 5 Wochen Wachstum. Hohe  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen sind nur in den Phospholipid-Fettsäuren messbar.

Signalfläche [%]		$\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte [‰] (n = 3)	
Fettsäuren der	(n = 6)	Biofilm A	Biofilm B
<b>Phospholipide</b>			
C16:1 $\omega$ 7	13.3 $\pm$ 4.5	295.5 $\pm$ 18.1	582.0 $\pm$ 6.7
C16:0	33.4 $\pm$ 5.8	2384.0 $\pm$ 119.2	2676.7 $\pm$ 21.2
C17:1 $\omega$ 6	4.5 $\pm$ 1.3	5277.1 $\pm$ 331.9	9475.0 $\pm$ 104.0
C17:0	1.4 $\pm$ 0.8	108.7 $\pm$ 72.1	251.0 $\pm$ 118.9
C18:1 $\omega$ 9	4.2 $\pm$ 0.6	3116.0 $\pm$ 744.4	4403.9 $\pm$ 183.0
C18:1 $\omega$ 7	35.9 $\pm$ 3.2	193.5 $\pm$ 19.7	235.0 $\pm$ 37.2
C18:0	6.1 $\pm$ 1.9	324.4 $\pm$ 31.0	582.7 $\pm$ 60.9
C20:1 $\omega$ 9	1.3 $\pm$ 0.3	217.3 $\pm$ 36.5	319.8 $\pm$ 31.7
<b>Glykolipide</b>			
C12:0	58.5 $\pm$ 3.0	-28.5 $\pm$ 0.6	-29.7 $\pm$ 0.2
C14:0	13.6 $\pm$ 0.6	-33.3 $\pm$ 0.1	-33.3 $\pm$ 0.7
C15:0	0.8 $\pm$ 0.1	-18.9 $\pm$ 4.8	-19.9 $\pm$ 0.6
C16:0i	0.6 $\pm$ 0.2	-10.9 $\pm$ 4.0	-16.3 $\pm$ 5.1
C16:0	9.1 $\pm$ 2.2	48.9 $\pm$ 2.7	28.0 $\pm$ 0.8
C17:1 $\omega$ 6	5.9 $\pm$ 2.4	-1.3 $\pm$ 0.3	16.7 $\pm$ 0.0
C17:0	0.5 $\pm$ 0.1	-30.1 $\pm$ 7.7	-32.1 $\pm$ 7.2
C18:1 $\omega$ 9	1.2 $\pm$ 0.7	103.7 $\pm$ 5.9	44.9 $\pm$ 0.6
C18:1 $\omega$ 7	0.4 $\pm$ 0.0	75.5 $\pm$ 0.8	126.9 $\pm$ 0.4
C18:0	9.5 $\pm$ 2.1	-22.1 $\pm$ 0.2	-24.7 $\pm$ 0.6

In den Glykolipiden machten die kurzen gesättigten Fettsäuren C12:0 und C14:0 zusammen mehr als 72 % der Gesamtfläche der Fettsäuren aus (Tab. 3.11). Beide Fettsäuren zeigten nach 5 Wochen Biofilmwachstum auf  $^{13}\text{C}$ -markiertem PCB keine Isotopenanreicherung, ebenso wie der Großteil der Fettsäuren der Glykolipide. Ausnahmen bildeten lediglich die einfach ungesättigten Fettsäuren C18:1 $\omega$ 7 und C18:1 $\omega$ 9 und die Palmitinsäure C16:0, wobei diese Anreicherungen mit Isotopenwerten von maximal  $\delta^{13}\text{C} = 127$  ‰ gegen PDB in C18:1 $\omega$ 7 des Biofilms B gering waren gegenüber den Anreicherungen in den Fettsäuren der Phospholipide, bei denen die niedrigste Anreicherung in der Fettsäure C17:0 einen Wert von  $\delta^{13}\text{C} = 109$  ‰ gegen PDB aufwies (Tab. 3.11).

Bei den Phospholipid-Fettsäuren wurden für C16:0 und C18:1 $\omega$ 7 die größten Signalfächen mit 33 % und 36 % an der Gesamtsignalfäche detektiert. Sehr hohe Isotopenanreicherungen mit  $\delta^{13}\text{C} = 2400$  ‰ (Biofilm A) und 2700 ‰ (Biofilm B) gegenüber PDB wurden in der ubiquitär vorkommenden Palmitinsäure (C16:0) gemessen (Abb. 3.28, A). Die stärker

vertretene ungesättigte Fettsäure C18:1 $\omega$ 7 war dagegen mit  $\delta^{13}\text{C} = 200\text{‰}$  gegen PDB nur relativ gering mit dem stabilen Isotop angereichert. Die höchsten Isotopenwerte wurden in den einfach ungesättigten Fettsäuren C17:1 $\omega$ 6 ( $\delta^{13}\text{C} = 5300\text{‰}$  bzw. 9500 ‰) und der C18:1 $\omega$ 9 ( $\delta^{13}\text{C} = 3100\text{‰}$  bzw. 4400 ‰) gemessen. Beide hochmarkierten Fettsäuren machten nur einen Anteil von 4 bis 5 % der Gesamtsignalfäche der Fettsäuremethylester aus (Tab. 3.11).

In Abbildung 3.28 B sind die durchschnittlichen Flächenprozent der Fettsäuren der Biofilme zusätzlich mit den Flächenprozenten der Fettsäuren der zur Verfügung gestellten bakteriellen Isolate dargestellt, welche zuvor aus dem in diesem Versuch als Inokulum dienenden Boden oder von weiteren PCB-Biofilmen gewonnen wurden (Abraham *et al.*, 2003). Diese Isolate, die in Kap. 2.3.2 tabellarisch aufgelistet sind, wurden über ihre Lipidmuster, Wachstumstests und 16S-rDNA-Sequenzanalyse den Gattungen *Burkholderia*, *Methylobacterium*, der neu zu beschreibenden Gattung „*Wittenbergia*“ (im phylogenetischen 16S-rDNA-Stammbaum nahe der Gattung *Beijerinckia*) und *Arthrobacter* zugeordnet und die Flächenanteile der Fettsäuren gruppiert (Abb. 3.28, B).

Die im PCB-Biofilm abundanteste Fettsäure C18:1 $\omega$ 7 war die Hauptfettsäure der Isolate der Gattungen *Methylobacterium* und „*Wittenbergia*“ und wies im Biofilm kaum  $^{13}\text{C}$ -Markierung auf (Tab. 3.11 und Abb. 3.28). Die im Biofilm isotopenmarkierte Fettsäure C16:0 war in allen Isolaten vertreten und ließ daher keine Rückschlüsse auf die am PCB-Abbau beteiligten Bakterien zu. Als Biomarker-Molekül der isolierten Stämme konnte die methylierte Fettsäure C15:0a dienen, welche als Hauptfettsäure der Isolate der Gattung *Arthrobacter* detektiert wurde. Sie wurde jedoch im PCB-Biofilm nicht nachgewiesen. Auch die zyklische Fettsäure C19:0d7,8cy, die etwa 15 % der Phospholipid-Fettsäuren der Isolate der Gattung *Burkholderia* ausmachte, wurde im Biofilm nur in Spuren detektiert, welche für eine Isotopenanalyse nicht ausreichten. Im Gegensatz dazu war die Fettsäure C16:1 $\omega$ 7 im Biofilm stark vertreten und in den Isolaten nur in sehr geringen Mengen nachweisbar.

Die Fettsäuren C17:1 $\omega$ 6 und C18:1 $\omega$ 9 wurden nur in den Isolaten der Gattung *Burkholderia* synthetisiert und wiesen im Biofilm mit relativ geringen Abundanzen die höchste  $^{13}\text{C}$ -Markierung auf (Abb. 3.28 und Tab. 3.11). Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei den Bakterien, die das markierte 2,2'-Dichlorobiphenyl aufgenommen haben, nicht um Stämme der zahlenmäßig überwiegenden übrigen Gattungen, sondern um Bakterien der Gattung *Burkholderia* handelte.

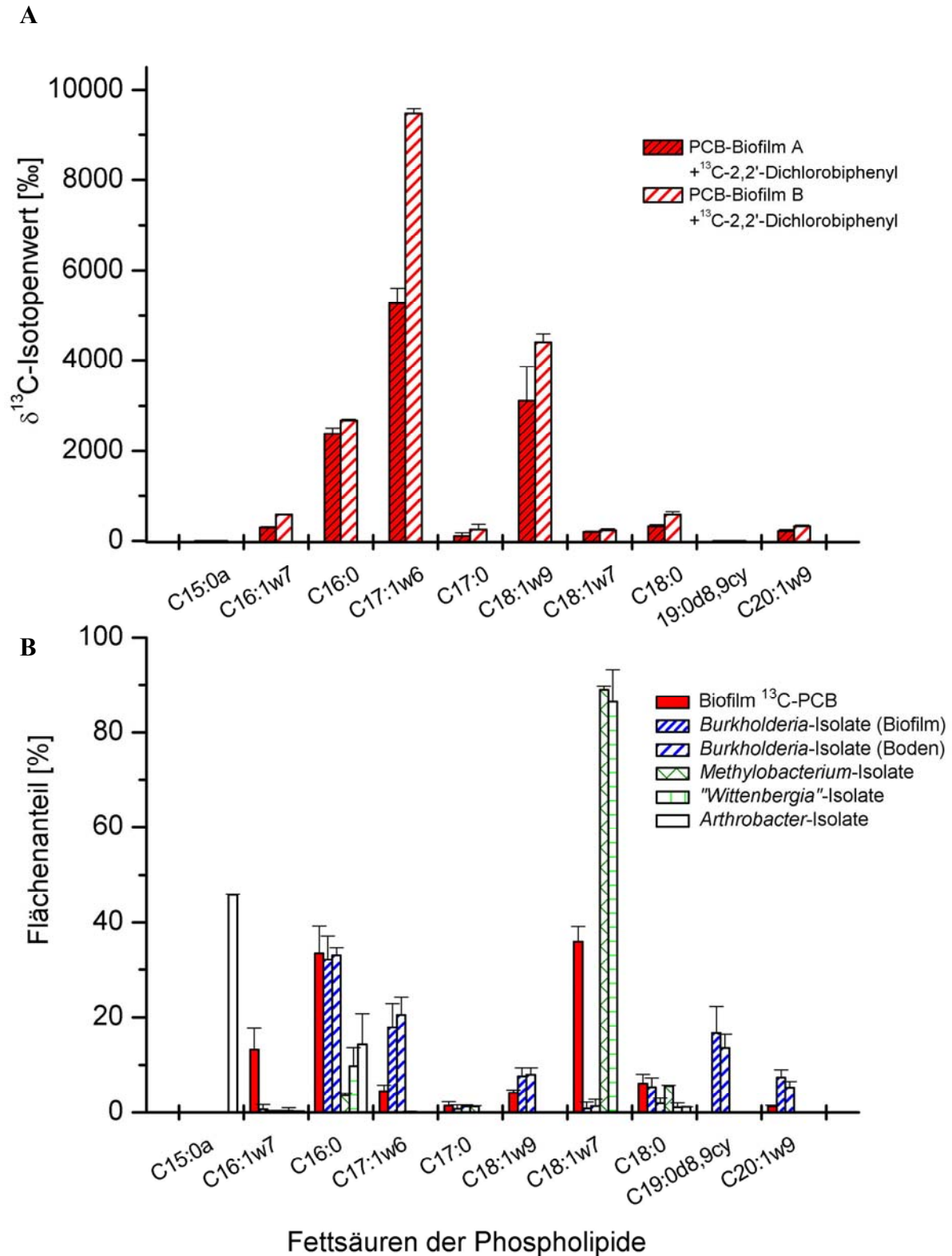


Abb. 3.28: Isotopenanreicherung in den Fettsäuren der Phospholipide von Biofilmen, gewachsen auf Arochlor 1242 und  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -2,2'-Dichloro-Biphenyl (A), und durchschnittliche Signalfläche der Fettsäuren der Biofilme und phylogenetischen Gruppen von isolierten Bakterien aus dem Biofilm und Boden (B). Die höchsten  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen wurden in den Fettsäuren C17:1w6 und C18:1w9 gemessen, welche in den Isolaten nur in der Gattung *Burkholderia* vorkamen.

### 3.8 Belebtschlamm als komplexes biologisches System

Der Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage wurde wie das zuvor beschriebene definierte Konsortium im Chemostaten sowie die auf polychlorierten Biphenylen aufgewachsenen Biofilme für eine Isotopenmarkierung mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-markierten Substraten genutzt. Bei Belebtschlamm handelt es sich um eine komplexe biologische Gemeinschaft mit großer mikrobieller Diversität, einer hohen Zelldichte und Organismen, die Schadstoffe wie chlorierte organische Verbindungen tolerieren und teilweise abbauen können (Whiteley und Bailey, 2000, Stoffels *et al.*, 1998 und Erb *et al.*, 1997). Durch das hohe Nährstoffangebot und gute Sauerstoffversorgung herrschen optimale Wachstumsbedingungen für eine Vielzahl an Mikroorganismen, so dass eine höhere Anzahl von Ribosomen und rRNA als im zuvor untersuchten PCB-Biofilm erwartet werden konnten (Neidhardt und Magasanik, 1960).

Im folgenden wird auf das Wachstum des Belebtschlammes unter Laborbedingungen in Batch- und kontinuierlicher Kultur sowie auf die Extraktion der Gesamt-RNA eingegangen (Kap. 3.8.1). Mittels SSCP-Fingerprintanalyse wurde die Diversität der rRNA vor und nach Separation mit phylogenetischen Sonden ermittelt (Kap. 3.8.2). Anschließend wurden die Isotopenwerte des Mediums, der Biomasse und anderer Zellkomponente vor und nach Zugabe von [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol bestimmt (Kap. 3.9.1). Neben [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol wurde in parallelen Batch-Kulturen [U- $^{13}\text{C}$ ]-markiertes Phenol, Histidin und Acetat zum Belebtschlamm gegeben und der Einbau in die Biomasse, RNA und Phospholipid-Fettsäuren analysiert (Kap. 3.9.2 und 3.9.3).

#### 3.8.1 Wachstum und RNA-Gehalt von Belebtschlamm unter Laborbedingungen

Der Belebtschlamm wurde vor der Markierung mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol in zwei parallelen Chemostaten über den Zeitraum von drei Wochen mit 25 %-igem synthetischem Abwasser und einer 1 mM 4-Cl-Catechol-Lösung als Substrate in kontinuierlicher Kultur beobachtet (Kap. 2.4.3). Ein vollständiger Volumenaustausch erfolgte innerhalb von 5 Tagen. Regelmäßige mikroskopische Überwachung ergab keine sichtbare Veränderung in der Struktur des Belebtschlammes.

Nach 2 Wochen Wachstum in kontinuierlicher Kultur wurde aus 2 ml Belebtschlamm mit Zentrifugationssäulenaufreinigung (Kap. 2.6.1.2)  $22 \pm 4 \mu\text{g}$ , mit mechanischer Auftrennung mit Glasbeads und denaturierendem GTC-Puffer (Kap. 2.6.1.1) jedoch  $40 \pm 4 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA extrahiert. Daher wurden die Extraktionen der Gesamt-RNA mit der letztgenannten Methode durchgeführt. Aus frischem Belebtschlamm, welcher in Batch-Kulturen über zwei Tage inkubiert und für  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente eingesetzt wurde (Kap. 3.10.2), wurden



je 3 ml für eine RNA-Extraktion entnommen und zwischen 67 und 107 µg Gesamt-RNA extrahiert.

### **3.8.2 Molekularbiologischer Fingerabdruck des Belebtschlamm vor und nach der Separation mit phylogenetischen Sonden**

Zur Bestimmung der Diversität der aktiven Bakterien im Belebtschlamm wurde aus verschiedenen Proben in Batch-Kulturen die Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und mit Primern, die an die 23S- und 16S-rDNA binden, Produkte von 440 (23S) bzw. 370 Basen (16S) vervielfältigt. Die com-Primer amplifizieren die mittlere variable Regionen V4 und V5 des 16S-rRNA-Moleküls (Schmalenberger *et al.*, 2001), die 23S-Primer die Basensequenz zwischen den Positionen 590 und 1050 (*E. coli*) im 23S-rRNA-Molekül (Kap. 2.9.2). Zusätzlich wurde die 23S-rRNA, welche durch die Sonden Gam 42a und Bet 42a mit Hilfe von paramagnetischen Partikeln abgetrennt wurde, und die durch die Sonden Eub 338 und Alf 1b separierte 16S-rRNA mit den jeweils passenden Primern amplifiziert. Alle PCR-Produkte wurden für die SSCP-Gele semikonservativ verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.9.2). Auf den analysierten SSCP-Gelen war eine große Anzahl (bis zu 70) von unterschiedlich intensiv gefärbten Banden sichtbar, die auf eine hohe mikrobielle Diversität im Belebtschlamm hinwiesen. 35 bis 50 % der Banden aus der Gesamt-RNA konnten auch in den Proben der mittels Bet 42a und Gam 42a separierten 23S-rRNA detektiert werden, 10 bis 18 % in der mittels Alf 1b separierten 16S-rRNA. 73 bis 85 % der Banden aus der Gesamt-RNA wurden in der mittels Eub 338 separierten rRNA nachgewiesen.

Die mittlere Diversität aus allen Proben berechnet nach Shannon und Weaver (1969) betrug bei den Gelen vom 26.11.02 und 11.12.02  $H' = 1.20 \pm 0.12$  und  $1.33 \pm 0.11$ . Allgemein wurde in der Gesamt-RNA wie erwartet eine höhere Diversität berechnet (Mittlere Diversität  $H' = 1.31 \pm 0.05$  und  $1.37 \pm 0.08$ ) als in der durch die Sonden separierten rRNA (Mittlere Diversität  $H'$  der Elutions-Lösung E =  $1.16 \pm 0.11$  und  $1.30 \pm 0.12$ ). Die Bandenmuster der einzelnen Proben wurden mit dem Programm GelCompar II analysiert, der Hintergrund subtrahiert, die unterschiedlichen Gele normalisiert und eine Clusteranalyse nach Jaccard (Legendre und Legendre, 1998) durchgeführt (Kap. 2.9.2; Abb. 3.29).

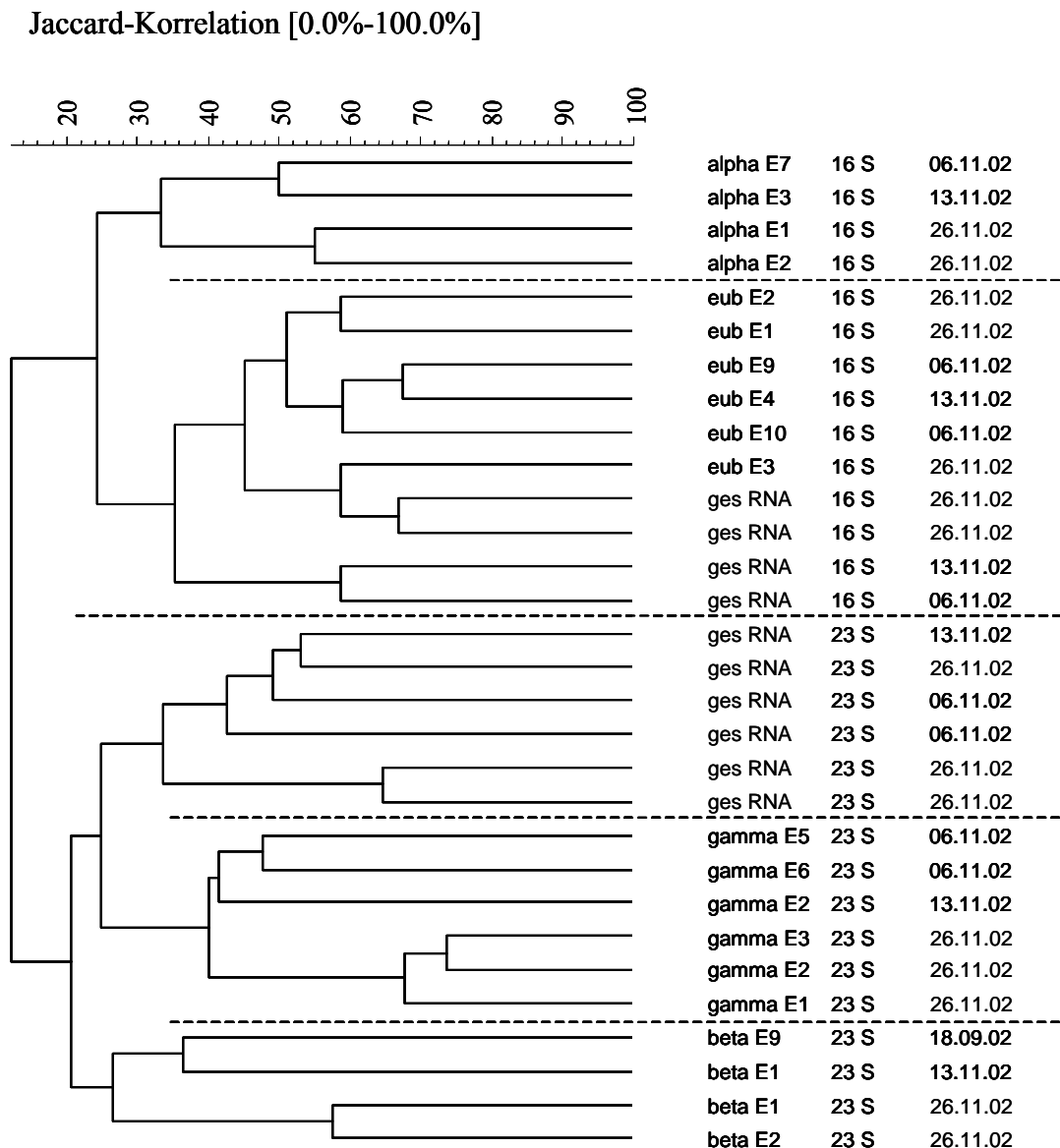


Abb. 3.29: Dendrogramm erstellt aus den Bandenmustern eines SSCP-Gels der durch die Sonden Gam 42a (gamma E), Bet 42a (beta E), Alf 1b (alpha E) und Eub 338 (eub E) separierten rRNA sowie der Gesamt-RNA (ges RNA), welche für die Hybridisierung mit den oben genannten Sonden eingesetzt wurde, mittels Jaccard-Korrelation. Die 16S-rRNA wurde über com-Primer amplifiziert, die 23S-rRNA über an konservierte Bereiche der 23S-rRNA bindende Primer (siehe Kap. 2.9.2). Das Datum gibt den Zeitpunkt der RNA-Extraktion aus Belebtschlamm an.

Die Clusteranalyse mittels Jaccard-Korrelation beschreibt eine deutliche Trennung der durch unterschiedliche Primerpaare amplifizierten 16S- und 23S-rRNA (Abb. 3.29). Innerhalb des 16S-Cluster unterscheidet sich die rRNA, welche durch die Sonde Alf 1b (alpha E) separiert wurde, deutlich von der durch die Sonden Eub 338 (eub E) separierten rRNA und der Gesamt-RNA. Die Proben der Gesamt-RNA und der Eubakterien (eub E) ähneln sich. Im 23S-Cluster setzen sich die rRNA separiert durch die Gam 42a- (gamma E) und Bet 42a-Sonden (beta E) von der Gesamt-RNA ab, die in der Hybridisierung eingesetzt wurde.

### 3.9 Isotopenmarkierung in Belebtschlamm

#### 3.9.1 Analyse des Belebtschlammes nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol

Die Isotopenmarkierung mit [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol wurde in diesem komplexeren System zur Identifikation möglicher Primärkonsumenten eingesetzt. Des weiteren sollte die Eignung der Methode für ökologische Fragestellungen untersucht werden.

Vor der Markierung mit <sup>13</sup>C-angereichertem Substrat wurden zunächst die natürlichen Isotopenwerte aller beteiligten kohlenstoffhaltigen Komponenten am EA-IRMS gemessen (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Prozentuale Anteile der verschiedenen C-haltigen Komponenten im LSSP-Medium an der Gesamt-Menge und am Gesamt-Kohlenstoff-Gehalt des Mediums sowie ihre natürlichen Isotopenwerte, die der Biomasse des Belebtschlammes und der Gesamt-RNA in kontinuierlicher Kultur vor der <sup>13</sup>C-Markierung. n = Anzahl der Messungen am EA-IRMS

Probe	Anteil in LSSP [%]	Anteil C in LSSP [%]	natürlicher Isotopenwert $\delta^{13}\text{C}$ [‰]	n
LSSP-Medium gesamt	100.0	100.0	-15.0 ± 0.4	5
Fleischextrakt	19.8	33.2	-22.8 ± 0.4	3
Casiton	14.5	25.9	-18.4 ± 0.3	3
D+Glucose	15.9	20.4	-10.2 ± 0.1	3
NaHCO <sub>3</sub>	39.9	18.2	-2.1 ± 0.4	3
Harnstoff	3.6	2.3	-35.4 ± 0.3	3
4-Cl-Catechol			-25.0 ± 1.3	5
Medium im Chemostaten (nach 2 Wochen Wachstum)			-10.9 ± 0.9	6
Gesamt-Biomasse			-20.0 ± 0.3	6
Gesamt-RNA			-28.1 ± 0.5	6

Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte der kohlenstoffhaltigen Komponenten des Mediums lagen im Bereich zwischen -2.1 ‰ gegen PDB in Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) und -35.4 ‰ in Harnstoff. Den größten prozentualen Anteil am Gesamtkohlenstoff des Mediums nahm mit 33.2 % das Fleischextrakt ein mit einem Isotopenwert von -22.8 ‰ gegen PDB, gefolgt von Casiton (25.9 %), D+Glucose (20.4 %) und Natriumhydrogencarbonat (18.2 %). Mittels einer Massenbalance aus den Isotopenwerten aller C-haltigen Komponenten wurde ein Isotopenwert für das Medium von  $\delta^{13}\text{C} = -15.6$  ‰ errechnet. Auffällig war, dass der Isotopenwert des Mediums im Chemostaten nach zweiwöchigem Wachstum in der kontinuierlichen Kultur mit einer Differenz von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = +4.8$  ‰ positiver war als das eingesetzte LSSP-Medium und um  $\Delta\delta^{13}\text{C} = +9.1$  ‰ positiver ist als der Wert der Biomasse des Belebtschlammes. Die Gesamt-RNA war um  $\Delta\delta^{13}\text{C} = -8.1$  ‰ weniger angereichert als die Biomasse und um  $\Delta\delta^{13}\text{C} = -17.3$  ‰ weniger angereichert als das Medium im Chemostaten. Der Isotopenwert der Biomasse (-20.0 ‰) wurde zwischen den beiden Hauptkomponenten

des Mediums Fleischextrakt (-22.8 ‰) und Casiton (-18.4 ‰) eingeordnet. Glucose mit einem Isotopenwert von -10.2 ‰ stellt den drittgrößten Kohlenstoffanteil des Mediums.

Für die Isotopenmarkierung in kontinuierlicher Kultur erfolgte die Zugabe von 1 mg [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol zu 1000 ml Belebtschlamm. In einer parallelen Kultur wurde Belebtschlamm die gleiche Menge an nicht markiertem 4-Cl-Catechol zugegeben. Zur Messung der Isotopenwerte des Mediums, der Biomasse und Gesamt-RNA wurden vor und direkt nach der Substratzugabe sowie nach 1 h, 6 h, 24 h und nach 3 Tagen Proben entnommen (Abb. 3.30).

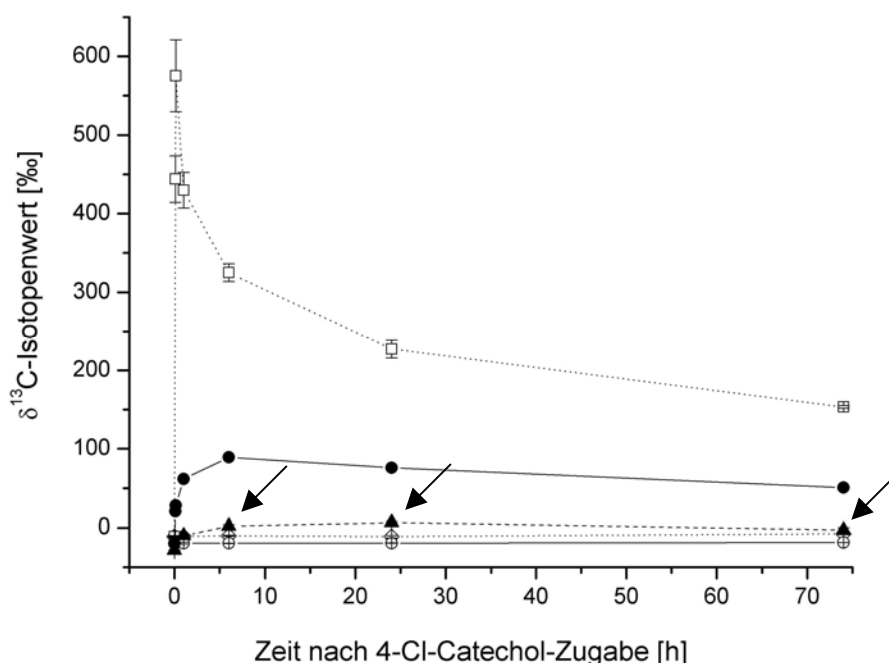


Abb. 3.30: Zugabe von 1 mg [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol als Puls-Markierung zu 1000 ml Belebtschlamm in kontinuierlicher Kultur. Die Analyse der Isotopenwerte in  $\delta^{13}\text{C}$  [‰] gegen PDB des Mediums ( $\square$ ), der gesamten Biomasse ( $\bullet$ ) und der Gesamt-RNA ( $\blacktriangle$ ) wurden über drei Tage vorgenommen. In einem parallelen Chemostaten erfolgte die Zugabe der gleichen Menge an nicht markiertem 4-Cl-Catechol ( $\diamond$  = Medium,  $\circ$  = Biomasse). Die mit Pfeilen gekennzeichnete  $^{13}\text{C}$ -angereicherte Gesamt-RNA wurde für die Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden eingesetzt.

Im Medium des Belebtschlammes wurde direkt nach Zugabe von markiertem 4-Cl-Catechol eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung bis  $\delta^{13}\text{C} = 600$  ‰ (jeweils gegen PDB) und in der Biomasse bis  $\delta^{13}\text{C} = 100$  ‰ 6 h nach Zugabe gemessen. In der Gesamt-RNA mit  $^{13}\text{C}$ -Markierung wurden nur Anreicherungen bis maximal  $\delta^{13}\text{C} = 6.7$  ‰ nach 24 h erreicht (siehe auch Tab. 3.13).

Direkt nach der Injektion des 4-Cl-Catechol konnte mit der HPLC (Kap. 2.1) eine Konzentration von 70  $\mu\text{M}$  im Chemostaten gemessen werden. Nach 15 min waren noch 32  $\mu\text{M}$  im Medium nachweisbar und nach 1 h lag die Konzentration von 4-Cl-Catechol unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC ( $< 1$   $\mu\text{M}$ ). Über den gesamten Messzeitraum konnte

keine Akkumulation anderer Metabolite wie z.B. Catechol, Protoanemonin, trans- und cis-Dienlacton, Maleyl- und cis-Acetyl-Acrylat festgestellt werden. Das Substrat 4-Cl-Catechol war bereits 1 h nach Zugabe vollständig vom Belebtschlamm aufgenommen worden.

Die Gesamt-RNA der kontinuierlichen Belebtschlamm-Kultur wurde vor der Markierung und 6 h, 24 h und 3 Tage nach der Markierung extrahiert und für die Hybridisierung mit an paramagnetischen Partikeln gekoppelten phylogenetischen Sonden (Eub 338, Bet- und Gam 42a) eingesetzt. Die Isotopenwerte der durch die Sonden abgetrennten rRNA wurden anschließend am EA-IRMS analysiert (Tab. 3.13 und Abb. 3.31).

Tab. 3.13: Isotopenwerte ( $\delta^{13}\text{C}$  [‰] gegen PDB) der Gesamt-RNA und der mit den Oligonukleotid-Sonden Eub 338, Bet 42a und Gam 42a separierten rRNA vor der  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol-Markierung (0 h) und nach 6 h, 24 h und 74 h in kontinuierlicher Kultur. Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 bis 9 Messungen am EA-IRMS. \*uD = unter Detektionsminimum des EA-IRMS.

	0 h	6 h	24 h	74 h
Gesamt-RNA	$-28.12 \pm 0.48$	$+2.16 \pm 2.03$	$+6.62 \pm 0.66$	$-2.58 \pm 2.99$
Eub 338	$-25.73 \pm 1.37$	$-16.96 \pm 3.93$	uD*	$-15.38 \pm 3.34$
Bet 42a	$-22.64 \pm 2.01$	$-19.87 \pm 2.09$	$-19.73 \pm 2.61$	$-21.12 \pm 2.84$
Gam 42a	$-24.99 \pm 0.60$	$-21.16 \pm 0.44$	$-20.21 \pm 5.82$	$-16.46 \pm 1.97$

Die Gesamt-RNA des Belebtschlammes in kontinuierlicher Kultur war 24 h nach der Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol mit einem Isotopenwert von  $\delta^{13}\text{C} = +6.62$  ‰ gegen PDB am stärksten angereichert. Die Isotopenwerte der durch die phylogenetischen Sonden separierten rRNA sind in Abb. 3.31 graphisch dargestellt.

In allen separierten rRNA-Fractionen des Belebtschlammes war eine Anreicherung mit  $^{13}\text{C}$  nach der Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol zu der kontinuierlichen Kultur erkennbar (Abb. 3.32). In der durch die Eub 338 - Sonde abgetrennten rRNA wurden bereits nach 6 h deutlich höhere Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = -17.0 \pm 3.9$  gegenüber  $-25.7 \pm 1.3$  (0 h) gemessen. Nach 74 h war die Anreicherung auf  $\delta^{13}\text{C} = -15.4 \pm 3.3$  ( $\Delta\delta^{13}\text{C} = +10.4 \pm 4.7$  ‰ gegenüber 0 h) angestiegen. In der rRNA separiert durch die Bet 42a - Sonde wurde dagegen nur eine leichte Anreicherung von  $\delta^{13}\text{C} = -22.6 \pm 2.0$  (0 h) auf maximal  $\delta^{13}\text{C} = -19.7 \pm 2.6$  nach 24 h ( $\Delta\delta^{13}\text{C} = +2.9 \pm 4.6$  ‰) gemessen. Eine kontinuierlich ansteigende  $^{13}\text{C}$ -Markierung war in der rRNA separiert durch die Gam 42a - Sonde sichtbar. Hier nahmen die Isotopenwerte über den Zeitraum von 3 Tagen von  $\delta^{13}\text{C} = -25.0 \pm 0.3$  (0 h) auf  $\delta^{13}\text{C} = -15.4 \pm 3.9$  ( $\Delta\delta^{13}\text{C} = +8.5 \pm 2.6$  ‰ gegen 0 h) zu. Durch die hohen Standardabweichungen (bei der Differenz wurden beide Standardabweichungen addiert) waren jedoch die Isotopenanreicherungen gegenüber den Proben ohne  $^{13}\text{C}$ -Markierung bei allen Messungen nicht signifikant.

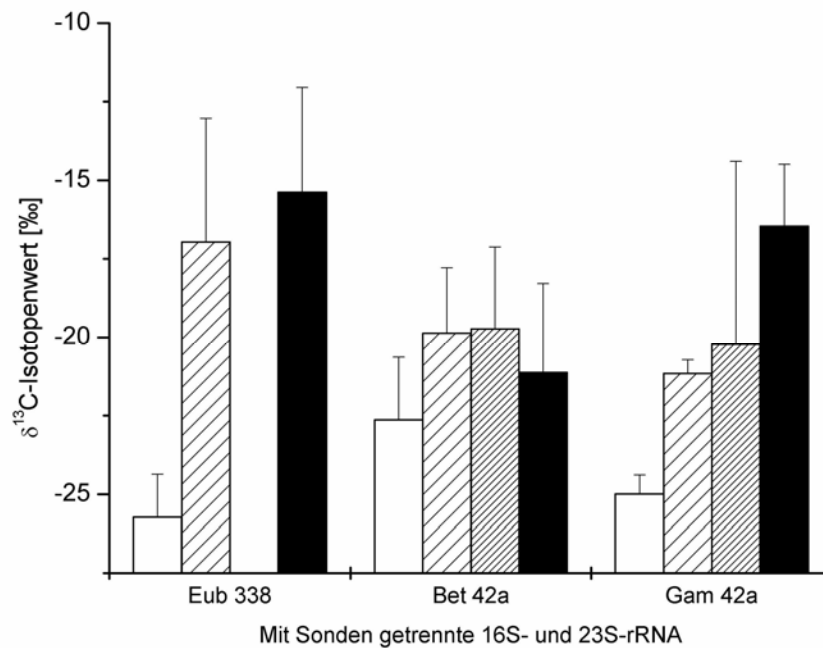


Abb. 3.31: Isotopenwerte ( $\delta^{13}\text{C}$  [‰] gegen PDB) der mit den Sonden Eub 338, Bet 42a und Gam 42a getrennten rRNA des Belebtschlammes vor der Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  (weiß) und 6 h (hellgrau), 24 h (dunkelgrau) und 74 h (schwarz) nach der Markierung in kontinuierlicher Kultur. Mittelwert und Standardabweichung aus je 3 bis 9 Messungen. Die Probe der Eub 338-Sonde 24 h nach der Markierung wurde wegen der zu geringen Signalstärke im EA-IRMS (Kap. 3.2) nicht berücksichtigt.

Um das Verhältnis der  $^{13}\text{C}$ -Markierung im Belebtschlamm zu erhöhen und damit eine höhere Anreicherung in der rRNA für die Hybridisierungsversuche zu erhalten, wurde 1 mg  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  zu 100 ml frischem Belebtschlamm in einer Batch-Kultur gegeben. Die Probenahmen erfolgten direkt vor (0 h) und 5 h, 10 h, 25 h und 50 h nach der Markierung mit  $^{13}\text{C}$  (Abb. 3.32).

Die Isotopenanreicherung in der Gesamt-Biomasse war bereits 10 min nach Substratzugabe zu der Batch-Kultur mit  $\delta^{13}\text{C} = 45 \pm 1$  ‰ gegen PDB sichtbar (Abb. 3.32) und stieg kontinuierlich auf  $\delta^{13}\text{C} = 106 \pm 6$  ‰ nach 50 h an. Der Isotopenwert der Gesamt-RNA betrug 10 h nach der  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$ -Markierung  $\delta^{13}\text{C} = 24 \pm 1$  ‰ und  $\delta^{13}\text{C} = 37 \pm 1$  ‰ nach 25 h.

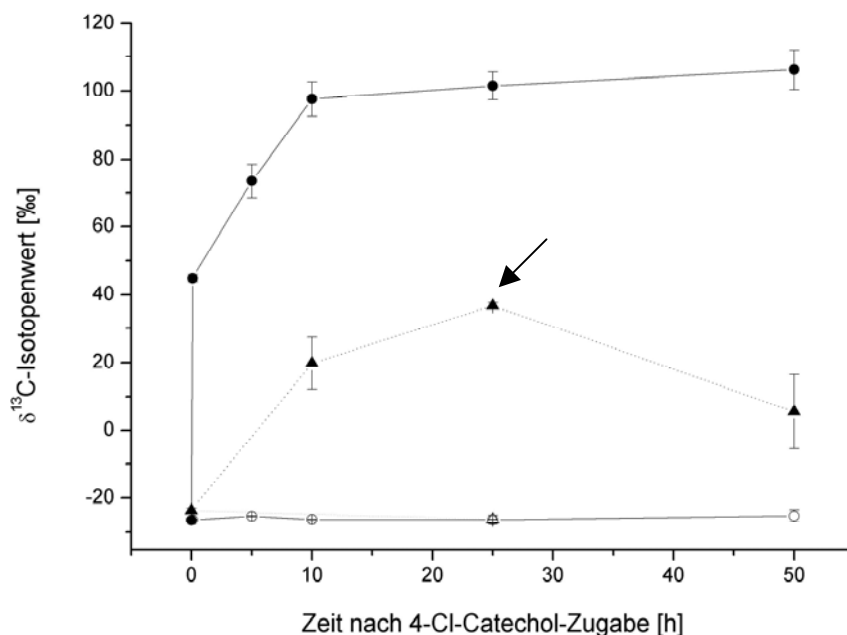


Abb. 3.32: Isotopenwerte ( $\delta^{13}\text{C}$  [‰] gegen PDB) der Biomasse (● und ○) und der Gesamt-RNA (▲ und △) über zwei Tage nach Zugabe von 1 mg  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -markiertem 4-Cl-Catechol (gefüllte Symbole) und der gleichen Menge unmarkiertem 4-Cl-Catechol in einem parallelen Ansatz (offene Symbole) zu 100 ml Belebtschlamm in Batch-Kulturen. Der Pfeil markiert die  $^{13}\text{C}$ -angereicherte Gesamt-RNA, die für die Separation mit Oligonukleotid-Sonden eingesetzt wurde.

In beiden Batch-Kulturen wurde mittels HPLC-Messungen des Mediums (Kap. 2.2.1) lediglich nach der Injektion von 4-Cl-Catechol eine leicht erhöhte Konzentration des Substrats ( $8\text{ }\mu\text{M}$ ) im Belebtschlamm nachgewiesen. Bei der zweiten Probenahme nach 5 h wurde 4-Cl-Catechol nicht mehr detektiert. Zusätzlich wurde photometrisch die Konzentration von 3-Hydroxy-Muconsäuresemialdehyd (HMSA), dem Metabolit von 4-Cl-Catechol, welches in der Chemostaten-Kultur nachgewiesen wurde (Kap. 3.5), analysiert (Kap. 2.2.2). In beiden Batch-Kulturen des Belebtschlammes kam es zu kurzzeitiger Konzentrationserhöhung von HMSA auf 3 bzw.  $9\text{ }\mu\text{M}$  direkt nach der Substrat-Zugabe auf  $28\text{ }\mu\text{M}$  bzw.  $13\text{ }\mu\text{M}$  nach 5 h. Nach 10 h sank die Konzentration im Ansatz ohne  $^{13}\text{C}$ -Markierung auf  $16\text{ }\mu\text{M}$  und nach 25 h war sie auf  $3\text{ }\mu\text{M}$  gesunken, während HMSA im Ansatz mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol bereits nach 10 h nicht mehr nachweisbar war. Weitere Metabolite (Kap. 2.2.1) wurden über den Probezeitraum in beiden Belebtschlamm-Kulturen nicht detektiert.

Zur Bestimmung der mikrobiellen Gruppen im Belebtschlamm, die das markierte Substrat aufgenommen hatten, wurde eine Hybridisierung mit der rRNA 25 h nach der  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol-Zugabe mit den phylogenetischen Sonden Eub 338, Bet 42a, Gam 42a und Alf 1b und anschließende Abtrennung mittels gekoppelter paramagnetischer Partikel durchgeführt

(Kap. 2.7.2.3). In Abb. 3.33 sind die Isotopenwerte der separierten rRNA mit Standardabweichungen aus je mindestens 3 Messungen dargestellt.

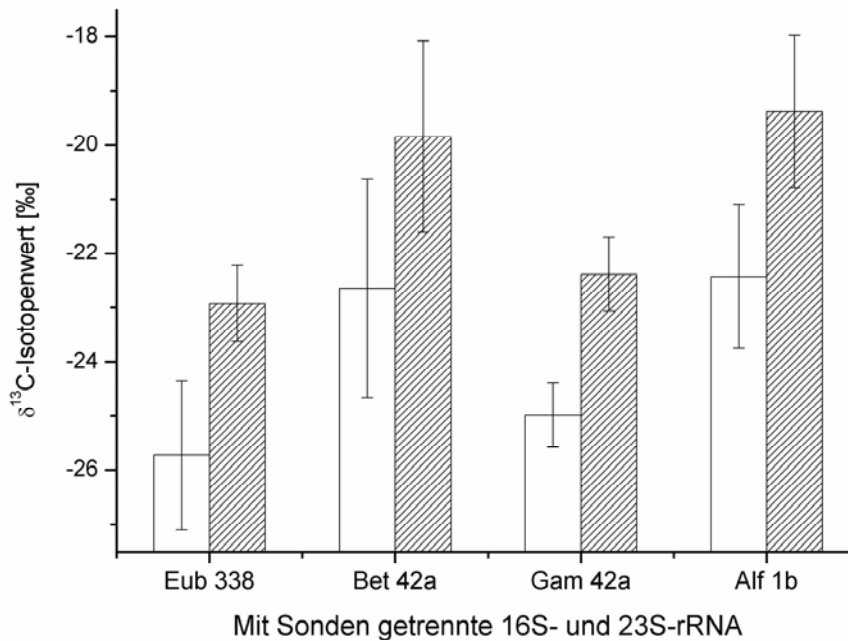


Abb. 3.33: Isotopenwerte ( $\delta^{13}\text{C}$  [‰] gegen PDB) der mit den Sonden Eub 338, Bet 42a, Gam 42a und Alf 1b abgetrennten rRNA aus Belebtschlamm in einer Batch-Kultur ohne  $^{13}\text{C}$ -Markierung (weiße Balken) und 25 h nach Zugabe von 1 mg  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  (graue Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus je 3 bis 5 Messungen.

In allen rRNA-Fraktionen wurden nach der Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  höhere Isotopenwerte gemessen als in der rRNA ohne Markierung (Abb. 3.33). Die Differenz zwischen beiden Proben betrug bei allen Sonden-Separationen im Durchschnitt  $\Delta\delta^{13}\text{C} = +2.8 \pm 2.5$  ‰ mit  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  Eub 338 =  $2.8 \pm 2.1$  ‰,  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  Bet 42a =  $2.8 \pm 3.8$  ‰,  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  Gam 42a =  $2.6 \pm 1.3$  ‰ und  $\Delta\delta^{13}\text{C}$  Alf 1b =  $3.0 \pm 2.7$  ‰. Um den größtmöglichen Fehler der Messung mit einzubeziehen, wurden zur Ermittlung der Standardabweichung bei der Isotopenanreicherung die einzelnen Standardabweichungen vor und nach der Markierung addiert. Aus diesem Grund konnte keine der analysierten rRNA-Proben mit stärkerem Isotopeneinbau gegenüber den anderen rRNA-Fraktionen herausgehoben werden, sondern lediglich eine Tendenz zur Isotopenanreicherung in allen analysierten Bakteriengruppen gemessen werden.



### 3.9.2 Markierung der rRNA des Belebtschlamm mit verschiedenen [U-<sup>13</sup>C]-Substraten in Batch-Kulturen

In Parallelansätzen mit je 100 ml Belebtschlamm wurde neben dem in Kap. 3.9.1 beschriebenen [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol markiertes [U-<sup>13</sup>C]-Phenol, -Histidin und -Acetat als Substrat zugegeben und in Batch-Kulturen über den Zeitraum von 2 Tagen analysiert. Die Menge an markiertem Kohlenstoff entsprach bei allen Substraten der Menge von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol. Zusätzlich wurde bei den 3 Substraten ein Parallelansatz mit jeweils der doppelten Menge an markiertem Kohlenstoff angesetzt (Abb. 3.34). Diese Experimente sollten die Eignung anderer Substrate als 4-Cl-Catechol und höherer <sup>13</sup>C-Markierungen für die Isotopenmarkierung in der rRNA überprüfen.

Die Isotopenwerte (jeweils gegen PDB) stiegen nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-Phenol im Medium in den ersten 10 h von  $\delta^{13}\text{C} = -14 \text{ ‰}$  auf 1400 ‰ (0.5 mg <sup>13</sup>C) bzw. 2400 ‰ (1 mg <sup>13</sup>C) an (Abb. 3.34, A). Nach 25 h sank dieser Wert auf  $\delta^{13}\text{C} = 750 \text{ ‰}$  bzw. 1300 ‰ und nach weiteren 25 h auf  $\delta^{13}\text{C} = 300 \text{ ‰}$  bzw. 475 ‰ ab. Die Biomasse erreichte Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = 200 \text{ ‰}$  bzw. 360 ‰ nach 5 bzw. 10 h, während in der Gesamt-RNA die maximalen Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = 350 \text{ ‰}$  bzw. 570 ‰ nach 50 h gemessen wurden.

In den Batch-Kulturen mit [U-<sup>13</sup>C]-Histidin wurde die höchste Anreicherung im Medium mit Werten von  $\delta^{13}\text{C} = 850 \text{ ‰}$  bzw. 5650 ‰ direkt nach der Markierung detektiert (Abb. 3.34, B). Die Isotopenwerte nahmen über den Zeitraum von 50 h kontinuierlich auf  $\delta^{13}\text{C} = 100 \text{ ‰}$  bzw. 630 ‰ ab. In der Biomasse wurden Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = 140 \text{ ‰}$  bzw. 340 ‰ in den ersten 10 h erreicht. Der Isotopenwert der Gesamt-RNA wurde 10 und 50 h nach Zugabe von 1 mg <sup>13</sup>C analysiert und wies zu beiden Zeitpunkten einen Wert von  $\delta^{13}\text{C} = 145 \text{ ‰}$  auf.

Im dritten Ansatz wurde [U-<sup>13</sup>C]-Acetat zum Belebtschlamm injiziert (Abb. 3.34, C). Hier wurden im Medium lediglich Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = 530 \text{ ‰}$  bzw. 830 ‰ in den ersten 10 h gemessen. Nach 50 h waren die Werte auf  $\delta^{13}\text{C} = 90 \text{ ‰}$  bzw. 150 ‰ abgesunken. Die Anreicherung in der Biomasse erfolgte sehr schnell. Direkt nach der Substratzugabe wurden die höchsten Isotopenwerte von  $\delta^{13}\text{C} = 115 \text{ ‰}$  bzw. 210 ‰ gemessen. Sie nahmen über den Zeitraum von 50 h nur langsam auf  $\delta^{13}\text{C} = 105 \text{ ‰}$  bzw. 175 ‰ ab. Die Anreicherung in der Gesamt-RNA wurde 10 und 50 h nach Zugabe von <sup>13</sup>C mit einem Wert von  $\delta^{13}\text{C} = 140 \text{ ‰}$  bestimmt.

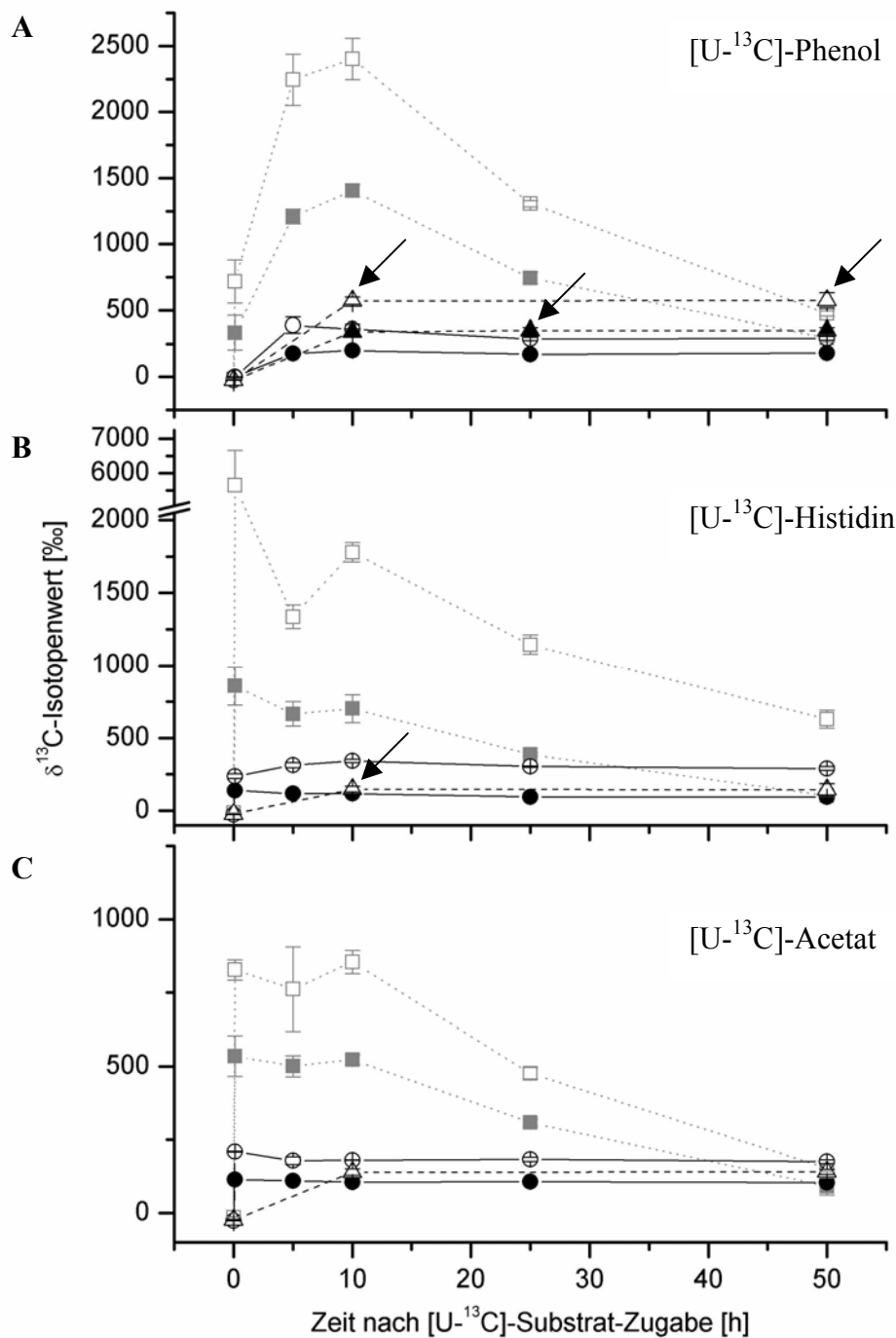


Abb. 3.34: Isotopenwerte ( $\delta^{13}C$  gegen PDB) des Mediums ( $\square$  und  $\blacksquare$ ), der Biomasse ( $\circ$  und  $\bullet$ ) und der Gesamt-RNA ( $\Delta$  und  $\blacktriangle$ ) nach Zugabe von 0.5 mg (gefüllte Symbole) bzw. 1 mg (offene Symbole)  $[U-^{13}C]$  zu 100 ml Belebtschlamm in Batch-Kulturen über den Zeitraum von 50 h. Die einzelnen Abbildungen zeigen den Einbau von  $[U-^{13}C]$ -Phenol (oben), von  $[U-^{13}C]$ -Histidin (Mitte) und von  $[U-^{13}C]$ -Acetat (unten). Die Pfeile markieren die für anschließende Hybridisierungen eingesetzte  $^{13}C$ -angereicherte Gesamt-RNA.

In allen Ansätzen war die Isotopenmarkierung im Medium direkt nach Substratzugabe am stärksten. Lediglich ein Teil des schweren Kohlenstoff-Isotops wurde in die Biomasse aufgenommen, wobei die höchsten Isotopenwerte in den ersten 5 bis 10 h gemessen wurden. Die Gesamt-RNA wies mit der Ausnahme von der Kultur mit  $[U-^{13}C]$ -Phenol nach 10 h

geringere Isotopenwerte als die Biomasse auf. Die Anreicherung in der rRNA nahm über den analysierten Zeitraum von 50 h nach der Zugabe des markierten Substrats kontinuierlich zu oder blieb konstant (Abb. 3.34). Von der in Abb. 3.34 mit Pfeilen markierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von phylogenetischen Sonden die rRNA abgetrennt und deren Isotopenwert bestimmt (Abb. 3.35).

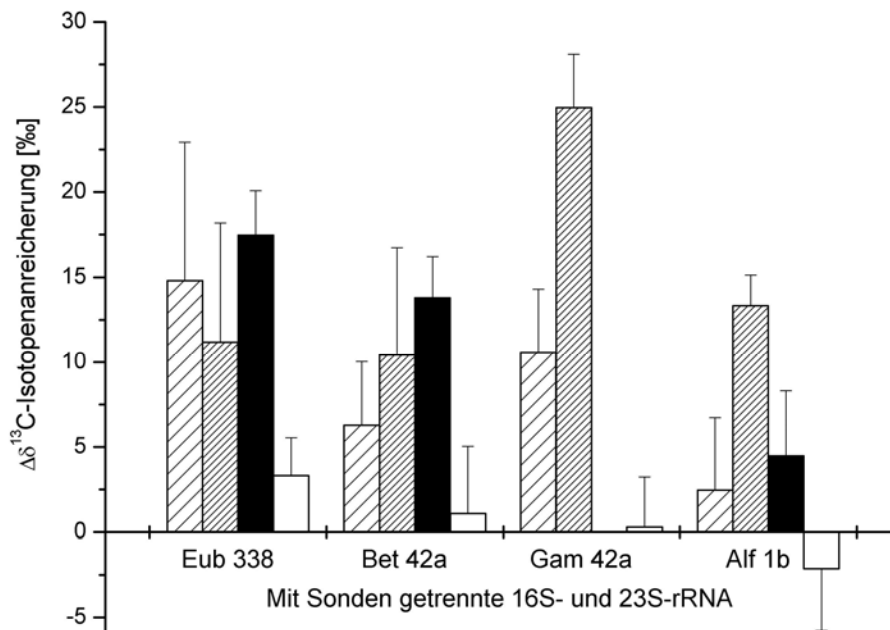


Abb. 3.35: Isotopenanreicherung der durch phylogenetische Sonden separierten rRNA aus Belebtschlamm, dem [U-<sup>13</sup>C]-markiertes Phenol (0.5 mg <sup>13</sup>C = hellgrauer Balken, 1.0 mg <sup>13</sup>C = dunkelgrauer und schwarzer Balken) oder Histidin (1.0 mg <sup>13</sup>C = weißer Balken) zugegeben wurde, gegenüber rRNA ohne <sup>13</sup>C-Markierung. Die eingesetzte Gesamt-RNA wurde 10 h (dunkelgrauer und weißer Balken), 25 h (hellgrauer Balken) und 50 h (schwarzer Balken) nach der Markierung extrahiert. Die Fehlerbalken entstanden durch Addition der Standardabweichungen der markierten und unmarkierten Probe aus mindestens 3 Parallelmessungen. Die Menge der durch die Gam 42a - Sonde separierten rRNA 50 h nach [U-<sup>13</sup>C]-Phenol-Zugabe lag unter der ermittelten Detektionsgrenze am EA-IRMS (Kap. 3.2).

Alle rRNA-Proben, die mittels phylogenetischer Sonden aus den Batch-Kulturen mit [U-<sup>13</sup>C]-markiertem Phenol isoliert wurden, waren gegenüber der unmarkierten Probe (0 h) mit <sup>13</sup>C angereichert (Abb. 3.35). Die Anreicherung der durch die Eub 338 - Sonde separierten rRNA betrug durchschnittlich  $\Delta\delta^{13}\text{C} = +14.5 \pm 5.9 \text{ ‰}$ , bei der höher markierten Gesamt-RNA (50 h)  $\Delta\delta^{13}\text{C} = +17.5 \pm 2.6 \text{ ‰}$ . Die Isotopenwerte der durch die Sonde Bet 42a separierten rRNA wurden durch die doppelte Menge an [U-<sup>13</sup>C]-Phenol (0.5 und 1 mg) und über den Zeitraum von 10 h und 50 h erhöht und erreichten eine maximale Anreicherung von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = +13.8 \pm 2.4 \text{ ‰}$  nach 50 h gegenüber der unmarkierten Probe (Abb. 3.35). Die höchste Isotopenanreicherung von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = 25.0 \pm 3.2 \text{ ‰}$  wurde in der rRNA gemessen, die 10 h nach Zugabe von 1 mg [U-<sup>13</sup>C]-Phenol durch die Gam 42a - Sonde abgetrennt wurde. Das Signal der durch die Gam 42a - Sonde separierten rRNA 50 h nach [U-<sup>13</sup>C]-Phenol-Zugabe lag unter

dem Detektionsminimum des EA-IRMS und konnte daher nicht ausgewertet werden. In der rRNA, die durch die Sonde Alf 1b separiert wurde, war nur in der Probe 10 h nach Zugabe von 1 mg  $[U-^{13}C]$  aus Phenol eine deutliche Anreicherung von  $\Delta\delta^{13}C = +13.3 \pm 1.8 \text{ ‰}$  gegenüber der unmarkierten Probe nachweisbar (Abb. 3.35).

In den rRNA-Fractionen des mit  $[U-^{13}C]$ -Histidin markierten Belebtschlammes wurden nur in der mit der Eub 338-Sonde separierten rRNA geringfügige  $[U-^{13}C]$ -Anreicherungen von  $\Delta\delta^{13}C = +3.3 \pm 2.2 \text{ ‰}$  gegenüber der unmarkierten rRNA gemessen. Die rRNA abgetrennt durch die Sonde Alf 1b wies hingegen eine Isotopenabnahme von  $\Delta\delta^{13}C = -2.1 \pm 3.6 \text{ ‰}$  auf. Mit Ausnahme der Eub 338-Sonde waren mit den genutzten Sonden nach  $[U-^{13}C]$ -Histidin-Zugabe keine signifikanten Unterschiede gegenüber der unmarkierten Probe detektierbar (Abb. 3.35).

### 3.9.3 Isotopenmarkierung in den Fettsäuren des Belebtschlammes

Zusätzlich zum Einbau der stabilen Isotope in die rRNA wurden die Isotopenwerte der Fettsäuren des Belebtschlammes in kontinuierlichen Kulturen nach 4 Wochen Wachstum mit Vollmedium und 4-Cl-Catechol sowie in den nur kurzfristig wachsenden Batch-Kulturen vor und nach der Zugabe von  $[U-^{13}C]$ -4-Cl-Catechol, -Phenol, -Histidin und -Acetat analysiert. Nach der Extraktion aller Fettsäuren (Kap. 2.11.1) und der gaschromatographischen Auftrennung wurden die einzelnen Fettsäuren über ihre Retentionszeit und mit Hilfe der Massenspektren identifiziert und die prozentuale Zusammensetzung errechnet (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: Flächenanteile der gesamten Fettsäuren des Belebtschlammes nach 4-wöchigem Wachstum in kontinuierlicher Kultur und nach 0 - 2 Tagen in Batch-Kultur. Die Standardabweichungen resultieren aus 12 bzw. 16 Einzelmessungen (nn = nicht nachweisbar).

Fettsäure	Belebtschlamm		Belebtschlamm	
	in Batch-Kultur		in kontinuierlicher Kultur	
C14:0	2.1	$\pm 0.4$	1.0	$\pm 0.2$
C15:0i	5.5	$\pm 0.7$	8.1	$\pm 2.0$
C15:0a	3.0	$\pm 0.5$	4.0	$\pm 0.7$
C15:0	1.2	$\pm 0.1$	0.6	$\pm 0.1$
C16:0i	0.8	$\pm 0.2$	1.7	$\pm 0.9$
C16:1 $\omega$ 7c	21.3	$\pm 2.5$	23.7	$\pm 2.0$
C16:1 $\omega$ 7t	2.7	$\pm 0.6$	3.9	$\pm 0.8$
C16:0	19.6	$\pm 0.8$	15.7	$\pm 1.2$
C17:0i	0.7	$\pm 0.2$	1.4	$\pm 0.3$
C18:2 $\omega$ 6,9	6.3	$\pm 0.4$		nn
C18:1 $\omega$ 9	14.2	$\pm 1.3$	3.2	$\pm 0.6$
C18:1 $\omega$ 7	14.3	$\pm 1.0$	30.3	$\pm 6.9$
C18:0	6.9	$\pm 1.6$	2.7	$\pm 0.5$
C19:0d7,8cy	0.3	$\pm 0.1$	1.7	$\pm 0.5$
C19:0	0.2	$\pm 0.5$		nn
C20:1 $\omega$ 9	0.9	$\pm 0.4$	2.0	$\pm 2.7$

Im Belebtschlamm waren am stärksten die einfach ungesättigten Fettsäuren C16:1 $\omega$ 7, C16:1 $\omega$ 9 und C18:1 $\omega$ 7 vertreten sowie die gesättigte Palmitinsäure (C16:0). Obwohl die meisten Fettsäuren in beiden Ansätzen vorkamen, waren Unterschiede zwischen der kontinuierlichen Kultur und der Batch-Kultur im Vorkommen einzelner Fettsäuren erkennbar. Zum Beispiel wurde die zweifach ungesättigte C18:2 $\omega$ 6,9 nur in der Batch-Kultur detektiert. Der prozentuale Anteil der Fettsäure C18:1 $\omega$ 7 nahm in der kontinuierlichen Kultur bei gleichzeitiger Abnahme der Fettsäure C18:1 $\omega$ 9 zu. Zudem waren die zyklische Fettsäure C19:0d7,8 und die langkettige C20:1 $\omega$ 9 zu einem höheren Prozentsatz in der kontinuierlichen Kultur vertreten als in der Batch-Kultur.

Die Isotopenanreicherungen in den Fettsäuren ( $\delta^{13}\text{C}$  in ‰ gegen PDB) wurden in allen 4 Batch-Kulturen des Belebtschlammes gemessen (Tab. 3.15). In Abb. 3.36 wurde ein Teil der Fettsäuren exemplarisch als Anreicherung gegenüber der unmarkierten Batch-Kultur graphisch dargestellt.

Tab. 3.15: Isotopenwerte ( $\delta^{13}\text{C}$  in ‰ gegen PDB) der Fettsäuren des Belebtschlammes in Batch-Kulturen vor sowie 5 und 25 h nach Zugabe von 0.5 mg  $^{13}\text{C}$  in [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol, [U- $^{13}\text{C}$ ]-Phenol, [U- $^{13}\text{C}$ ]-Histidin und [U- $^{13}\text{C}$ ]-Acetat. Die Werte der ubiquitären Palmitinsäure (C16:0) sowie besonders hohe Anreicherungs-werte sind hervorgehoben.

Isotopenwerte $\delta^{13}\text{C}$ [‰] PL-FAMES	0 h	[U- $^{13}\text{C}$ ]- 4-Cl-Catechol		[U- $^{13}\text{C}$ ]- Phenol		[U- $^{13}\text{C}$ ]- Histidin		[U- $^{13}\text{C}$ ]- Acetat	
		5 h	25 h	5 h	25 h	5 h	25 h	5 h	25 h
C14:0	-22.8	4.8	11.0	169.0	153.4	22.4	10.7	164.3	159.1
C15:0i	-28.6	5.4	5.5	85.8	73.4	92.2	62.7	153.2	81.7
C15:0a	-23.6	-3.3	-16.9	137.0	84.0	85.4	76.0	191.7	86.7
C15:0	-24.2	30.1	9.8	<b>411.4</b>	<b>189.1</b>	<b>281.8</b>	<b>78.9</b>	<b>521.7</b>	<b>269.3</b>
C16:0i	-12.9	20.4	0.5	254.3	207.4	119.3	147.4	139.6	77.3
C16:1 $\omega$ 7c	-34.2	-0.2	7.3	<b>545.7</b>	<b>677.4</b>	-15.3	-9.7	<b>232.8</b>	<b>263.8</b>
C16:1 $\omega$ 7t	-23.6	-8.2	-1.9	6.2	49.0	-14.7	0.6	15.3	13.9
<b>C16:0</b>	<b>-29.4</b>	<b>16.6</b>	<b>40.2</b>	<b>263.3</b>	<b>327.2</b>	<b>-1.6</b>	<b>8.1</b>	<b>155.7</b>	<b>222.5</b>
C17:0i	-21.9	11.4	13.8	107.6	100.5	37.9	31.4	93.2	41.0
C18:2 $\omega$ 6,9	-30.0	-25.5	-26.7	-19.0	-28.4	-26.3	-26.7	-24.4	-29.7
C18:1 $\omega$ 9	-28.4	-19.0	-16.5	70.6	52.8	-18.2	-12.1	-11.3	-4.6
C18:1 $\omega$ 7	-34.1	<b>85.0</b>	<b>126.7</b>	175.9	184.6	64.6	65.6	137.5	167.6
C18:0	-26.9	-17.5	-10.9	27.3	46.5	-16.6	-10.9	-5.4	6.2
C19:0d7,8cy	-23.8	<b>73.1</b>	<b>162.6</b>	9.9	-19.6	29.5	113.0	-4.7	23.2
C19:0	-20.1	9.2	52.0	208.7	177.9	88.4	85.0	152.3	89.3
C20:1 $\omega$ 9	-22.8	-21.6	-10.8	-15.6	6.8	-16.1	-9.1	-7.4	-2.8

Nach Zugabe von [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol sind die Fettsäuren C18:1 $\omega$ 7 und C19:0d7,8cy am stärksten angereichert, bei [U- $^{13}\text{C}$ ]-Phenol sind es C16:1 $\omega$ 7c, C16:0 und die Fettsäure C15:0, die auch bei den Ansätzen mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-Histidin und -Acetat die größten Isotopenänderungen gegenüber der unmarkierten Probe erreichte (Tab. 3.15 und Abb. 3.36).

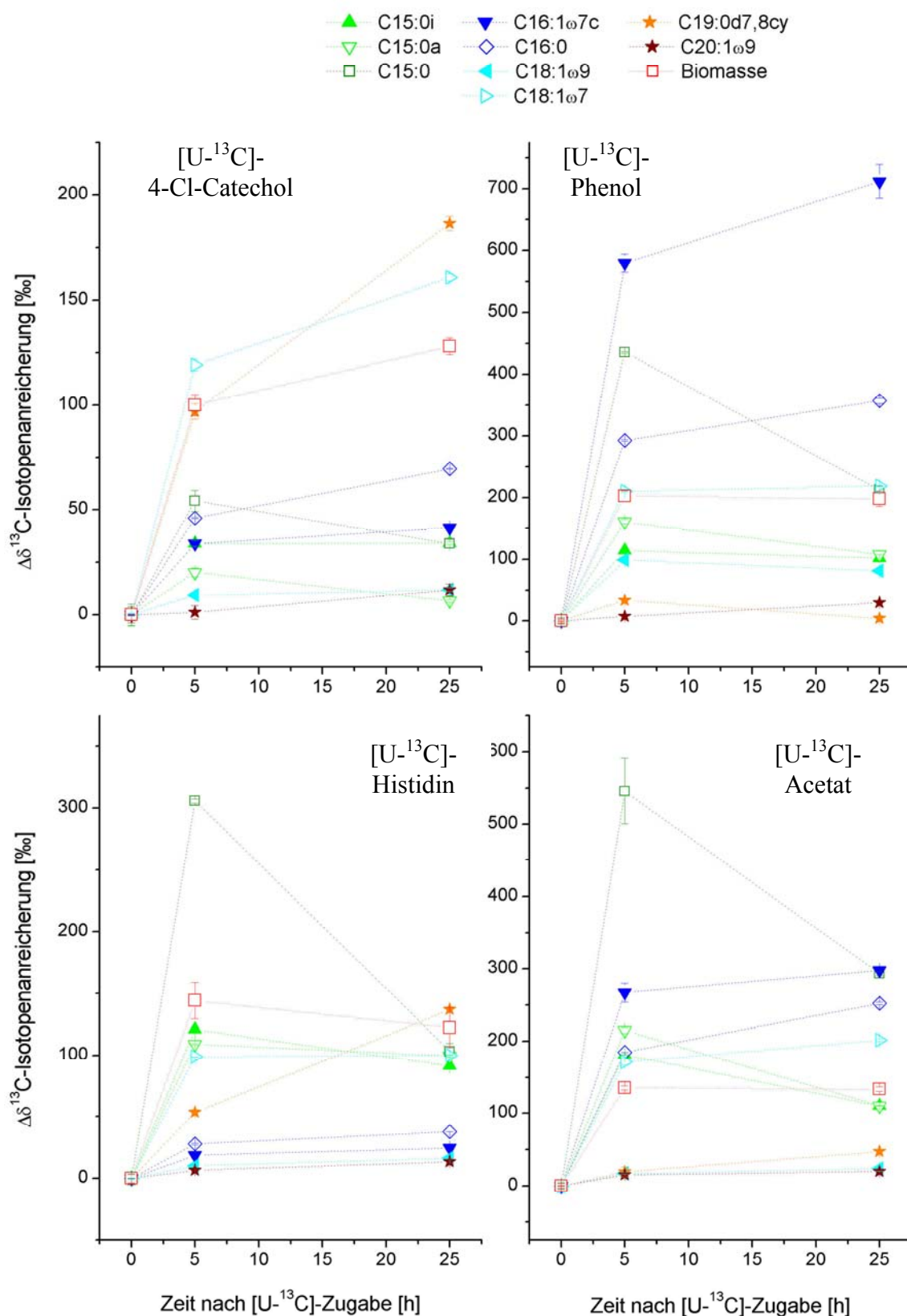


Abb. 3.36: Isotopenanreicherung in den Fettsäuren des Belebtschlammes in Batch-Kulturen 5 und 25 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol, -Phenol, -Histidin und -Acetat gegenüber der unmarkierten Probe. Zusätzlich ist die Anreicherung in der Gesamt-Biomasse (□) dargestellt.

Die höchsten  $^{13}\text{C}$ -Isotopenwerte wurden in der Fettsäure C16:1 $\omega$ 7c mit  $\delta^{13}\text{C} = 677 \text{ ‰}$  25 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Phenol zum Belebtschlamm gemessen (Tab. 3.15 und Abb. 3.36). Diese Fettsäure war auch in dem Ansatz mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat hoch angereichert ( $\delta^{13}\text{C} = 264 \text{ ‰}$ ). Hier wurde in der gesättigten Fettsäure C15:0 mit  $\delta^{13}\text{C} = 520 \text{ ‰}$  bereits 5 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat eine höhere Markierung detektiert. C15:0 ist die am stärksten angereicherte Fettsäure nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Histidin ( $\delta^{13}\text{C} = 281 \text{ ‰}$ ), gefolgt von C16:0i mit  $\delta^{13}\text{C} = 147 \text{ ‰}$  nach 25 h.

Fünf Stunden nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol zu Belebtschlamm war die einfach ungesättigte Fettsäure C18:1 $\omega$ 7 und 25 h nach der Markierung die Fettsäure C19:0d7,9cy am stärksten mit  $^{13}\text{C}$  angereichert. Die Fettsäure C16:1 $\omega$ 7c war in diesem Ansatz wie nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Histidin gegenüber der Gesamt-Biomasse nur geringfügig markiert (Abb. 3.36).

Im Belebtschlamm wurde C15:0 nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Histidin und  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat als die Fettsäure mit der stärksten Isotopenmarkierung detektiert (Abb. 3.36). C15:0i, C15:0a und C17:0i zeigten in allen Ansätzen lediglich mittlere bis niedrige Anreicherungswerte gegenüber den anderen Fettsäuren (Tab. 3.15). Bei allen Ansätzen wurde in der Fettsäure C20:1 $\omega$ 9 eine langsame Anreicherung mit dem stabilen Isotop auf maximal  $\delta^{13}\text{C} = 6.8 \text{ ‰}$  nach 25 h gemessen, während in der Fettsäure C18:2 $\omega$ 6,9 nur eine geringe Anreicherung mit  $^{13}\text{C}$  (bis  $\delta^{13}\text{C} = -19 \text{ ‰}$ ) nach der Zugabe aller markierten Substrate sichtbar war.

## 4 DISKUSSION

Zur Aufklärung von Biodegradationswegen und metabolischen Netzwerken wurde in den vergangenen Jahren zunehmend die Isotopenanalyse in der mikrobiellen Ökologie eingesetzt (Coffin *et al.*, 1990; Boschker *et al.*, 1998; Pelz *et al.*, 2001; Pombo *et al.*, 2002; Mauclaire *et al.*, 2003). Sie ermöglichte in extremen Habitaten wie der Tiefsee die Identifizierung von methanogenen Bakterien und trug damit zur Aufklärung wichtiger Stoffflüsse in diesem Ökosystem bei (DeLong, 2000; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001). Hier kamen der Analyse im Vergleich zu den übrigen organischen Kohlenstoffquellen die geringen Anteile an  $^{13}\text{C}$  im Methan zugute, dessen niedrige Isotopenwerte sich in Biomarker-Molekülen der Fettsäuren und Isoprenoiden wiederfanden. Das Spektrum der natürlichen Isotopenwerte verschiedener chemischer Verbindungen ist normalerweise jedoch nicht ausreichend, um Unterschiede zwischen den möglichen Substraten und Bakteriengruppen zu detektieren. Hier wird auf die Markierung mit geringen Mengen von  $^{13}\text{C}$ -angereichertem Substrat zurückgegriffen, um den Kohlenstoff aus dem Substrat in den anschließend analysierten Zellen und Molekülen zu bestimmen (Boschker *et al.*, 2002; Pelz *et al.*, 1999 und 2001). Biomarker-Moleküle wie Fettsäuren, Proteine und Aminosäuren sowie Nuklein- oder Ribonukleinsäuren liefern abhängig von ihrer phylogenetischen Auflösung Informationen über die in einer Biozönose vorhandenen Organismen (Kap. 1.1). Hierbei ist besonders die Stabilität der Biomoleküle während und nach der Extraktion und die Verbindung mit lebenden Zellen (RNA und Phospholipid-Fettsäuren werden nach dem Zelltod schnell abgebaut) zu beachten. Zudem sollten nicht kultivierbare Organismen eingeschlossen werden. Kinetische Faktoren, welche Einfluss auf den Isotopeneinbau in das Biomolekül nehmen können, sowie die Quantität der Moleküle innerhalb der Zellen sind für die anschließende Isotopenanalyse von Bedeutung (Kap. 4.1.3). Durch den Nachweis einer Isotopenmarkierung in Biomarker-Molekülen können ihre phylogenetischen Informationen mit der Substrataufnahme und -metabolisierung verknüpft werden und so kultivierungsunabhängig die am Abbau beteiligten Bakterien identifiziert werden (Abraham *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des stabilen Isotops  $^{13}\text{C}$  der Kohlenstofffluss von den markierten Substraten 4-Cl-Catechol, chloriertem Biphenyl und Phenol in bakteriellen Gemeinschaften verfolgt, um so primäre Abbauer zu bestimmen. Bevor die Methode in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften genutzt werden konnte, ist sie anhand von Reinkulturen im Batch und in einem definierten bakteriellen Konsortium in kontinuierlicher Kultur (Chemostat) angewendet worden. Mögliche Biomarker-Moleküle wurden ausgewählt, deren Separation optimiert sowie Kontrollen ihrer Spezifität, Reinheit und Eignung zur Isotopenanalyse durchgeführt. Neben den etablierten Messungen von PL-FAMES am GC-C-IRMS wurde die mittels Oligonukleotid-Sonden separierte rRNA bestimmter Bakteriengruppen auf ihren Isotopeneinbau überprüft.



#### 4.1 Auswahl von Biomarker-Molekülen für die Isotopenanalyse

Die Fettsäuren der Phospholipide (PL-FA) sind dank ihres (mit Ausnahme der Archaea) ubiquitären Vorkommens, ihres nahezu konstanten Prozentsatzes in der bakteriellen Biomasse und ihres schnellen Abbaus außerhalb von lebenden Zellen als Biomarker in ökologischen Studien etabliert (Kap. 1.1) und ermöglichen Aussagen über das Vorkommen bzw. die prozentuale Verteilung von bestimmten Bakteriengruppen in einem Ökosystem (White *et al.*, 1996). Neben strukturellen Informationen können nach der Aufnahme von Kohlenstoff aus  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat zudem funktionelle Informationen gewonnen werden.

Ein Vorteil der Fettsäuren gegenüber anderen Makromolekülen liegt darin, dass sie vor der Isotopenmessung gaschromatographisch am GC-C-IRMS aufgetrennt und einzeln analysiert werden können. Die Identifikation der gemessenen Fettsäuren, die zunächst anhand der Retentionszeit erfolgt, sowie die Kontrolle ihrer Reinheit geschah in der vorliegenden Arbeit mittels eines dem GC angeschlossenen Massenspektrometers (Kap. 2.12.2). Bei der Isotopenanalyse der Fettsäuren ist man zur Interpretation der Werte auf Biomarker-Moleküle angewiesen, die Rückschlüsse auf Bakteriengruppen zulassen. Meist weisen diese lediglich eine begrenzte phylogenetische Auflösung auf (Boschker *et al.*, 1999). Die Isotopenmessung der Fettsäuren einer mikrobiellen Gemeinschaft gibt jedoch immer wertvolle Hinweise auf die biologische Mineralisierung der markierten Substrate. So wurde in dieser Arbeit die Aufnahme des  $^{13}\text{C}$ -markierten 4-Cl-Catechols durch die Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 mittels Fettsäureanalytik bestätigt. Aufgrund der Ähnlichkeit der Fettsäureprofile (Tab. 3.9) konnten beide Stämme in Bezug auf die Substrataufnahme jedoch nicht unterschieden werden.

Biomarker-Moleküle mit höherer phylogenetischer Auflösung als Fettsäuren stellen die Nukleinsäuren dar. Das Gen der 16S-rRNA (16S-rDNA) kann auf Basis ihrer Sequenzunterschiede differenziert werden und wird heute dank ihrer konservierten und variablen Bereiche am häufigsten zur taxonomischen Identifizierung von Bakterien herangezogen, was zu einer kontinuierlich anwachsenden und allgemein zugänglichen Datenbank von Sequenzen geführt hat (Kap. 1.1). Die Analyse der rRNA-Moleküle verschiedener Mikroorganismen schließt auch nichtkultivierte Organismen ein. Die rRNA hat gegenüber der DNA den Vorteil, dass sie abhängig von der Ribosomenanzahl und damit auch von der Aktivität der Zelle in einer sehr viel höheren Kopienzahl vorliegt als die DNA. Die Menge an Kohlenstoff, welche gerade für die Isotopenanalyse der Biomoleküle am EA-IRMS von Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit durch die Auswahl des dem 16S-rRNA-Moleküls ähnlichen 23S-rRNA-Moleküls annähernd verdoppelt.

Um die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften nicht zu verändern oder einzelne Organismen zu vergiften, wurden in dieser Arbeit lediglich geringe Mengen von  $^{13}\text{C}$ -

markiertem Substrat zugegeben. Nach einem Markierungsexperiment ist bei Nukleinsäuren mit einem Anteil von über 10 atom% an  $^{13}\text{C}$  die Abtrennung von unmarkierten Nukleinsäuren durch Dichtegradientenzentrifugation möglich (Radajewski *et al.*, 2000; Manefield *et al.*, 2002 a und b). Bei geringeren Isotopenanreicherungen wie in dieser Arbeit (im Bereich von 0.01 bis 1 atom% an  $^{13}\text{C}$ ) müssen die rRNA-Moleküle vor der Isotopenanalyse z.B. durch Hybridisierungen mit Oligonukleotid-Sonden getrennt werden (MacGregor *et al.*, 2002).

#### 4.1.1 Entwicklung stammspezifischer Oligonukleotid-Sonden

In der Molekularbiologie wurden verschiedenste Hybridisierungstechniken etabliert. Bei der DotBlot-Hybridisierung werden die isolierten Nukleinsäure-Moleküle auf einer Membran immobilisiert, an die die Sondenanlagerung erfolgt (Kap. 2.7.1) und wird vor allem zum schnellen Vergleich verschiedener Sonden oder Nukleinsäure-Proben verwendet. Das Southern- und Northern-Blotting beinhaltet zusätzlich die gelelektrophoretische Auftrennung eines DNA- bzw. RNA-Gemisches und Bindung der Nukleinsäuren aus dem Gel an eine Membran, wohingegen bei der *in situ* Hybridisierung (FISH) die markierten Oligonukleotid-Sonden sich direkt innerhalb der fixierten, aber noch intakten Zelle an ihre Zielsequenz anlagern und unter dem Mikroskop detektiert werden, so dass auch Menge und Anordnung der markierten Zellen innerhalb einer Gemeinschaft erfasst werden (Amann *et al.*, 1990).

Für die Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden stellt die 16S- und 23S-rRNA durch ihre variablen und konservierten Sequenz-Bereiche ein ideales Ziel zur Entwicklung von Sonden unterschiedlicher Spezifität dar (Amann *et al.*, 1995 b). In den letzten Jahren wurden gezielt unterschiedlichste Taxa-spezifische Sonden gegen einzelne Stämme, Gattungen oder ganze Reiche entwickelt (Amann und Ludwig, 2000, Behrens *et al.*, 2003). Einige dieser Oligonukleotid-Sonden wie die Gam 42a und Bet 42a, welche an das 23S-rRNA-Molekül von Gamma- und Betaproteobakterien binden, sowie die Alf 1b und Eub 338 Sonden gegen das 16S-rRNA-Molekül von Alphaproteobakterien und ein Großteil der Eubakterien (Amann *et al.*, 1990; Manz *et al.*, 1992) wurden in dieser Arbeit eingesetzt. Zusätzlich wurden stammspezifische Oligonukleotid-Sonden gegen die vier Stämme (MT1 bis MT4) des definierten mikrobiellen Konsortiums entwickelt (Kap. 3.1.1), um die rRNA-Moleküle der einzelnen Stämme in der Chemostat-Kultur zu detektieren und anschließend abzutrennen.

Einen wichtigen Aspekt bei allen Hybridisierungen stellt die Spezifität der einzelnen Sonden gegenüber den Zielmolekülen dar. Um diese Spezifität zu erreichen, muss ein Sequenzabschnitt mit möglichst geringen Übereinstimmungen zu anderen Molekülen ebenso im Konsortium vorkommender Stämme gewählt werden. Die großen Sequenzähnlichkeiten in der 23S-rRNA zwischen den Stämmen, insbesondere zwischen *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, erschwerte die Findung einer geeigneten Sonde für jeden Stamm (Kap. 3.1.1 und

Alignment im Anhang). Die in Datenbanken verfügbaren phylogenetischen Oligonukleotid-Sonden gegen einzelne Stämme der Gattung *Pseudomonas*, welche an die 23S-rRNA binden (Schleifer *et al.*, 1992), waren an Sequenzabschnitten lokalisiert, welche bei *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4 übereinstimmten, so dass sie zur spezifischen Detektion nicht herangezogen werden konnten.

Oligonukleotid-Sonden sind unter stringenten Hybridisierungsbedingungen in der Lage, zwischen komplementären und nahezu komplementären Sequenzen auf der Basis eines einzigen Basenaustausches zu unterscheiden (Manz *et al.*, 1992). Von entscheidender Bedeutung ist hier sowohl die Position der ausgetauschten Base als auch die jeweilige Basenzusammensetzung. Basenfehlpaarungen wirken sich an den 3'- und 5'-Enden weniger stabilisierend aus als im inneren Bereich der Oligonukleotide. Die neu entwickelten Sondenvorschläge zeichneten sich daher durch maximale Anzahl an Fehlpaarungen zu den übrigen drei Stämmen im möglichst zentralen Bereich der Oligonukleotide aus (Tab. 3.1 und 3.2). Das Oligonukleotid sollte zudem keine Schleifenbildung bzw. Bindung zu sich selbst oder weiteren Molekülen aufweisen (Kilpper-Bälz, 1991). Die Spezifität der Bindung konnte während der Hybridisierung und bei den anschließenden Waschschritten durch Formamidkonzentrations- und Temperaturerhöhung sowie sukzessive Verringerung der Salzkonzentration gesteigert werden. Durch beide Maßnahmen werden falsch gebundene Sonden von dem RNA-Molekül abgetrennt (Stahl und Amann, 1991). Zusätzlich ist der Einsatz sogenannter „Helfer-Sonden“ und „Kompetitor-Sonden“ bei einigen Hybridisierungen von Vorteil, da sie die Bindung der eigentlichen Sonde durch das Aufbrechen von Sekundärstrukturen verbessern oder die Spezifität der Bindung erhöhen, indem sie ähnliche Sequenzabschnitte an anderen rRNA-Molekülen abdecken (Fuchs *et al.*, 2000 a). Bei Hybridisierungen mit den Sonden Bet 42a und Gam 42a, welche sich nur in einer Base unterscheiden (Manz *et al.*, 1992), wurde daher stets die unmarkierte Kompetitor-Sonde zur Hybridisierungslösung gegeben, um Falschpaarungen der markierten Sonde zu verhindern.

Die DotBlot-Hybridisierungen dienten zur Untersuchung der Spezifität und Bindungseffizienz der neu generierten Sonden. Sie ergaben mit den selbst generierten Sonden keine oder lediglich geringe Signale im Vergleich zu den Positivkontrollen mit den etablierten phylogenetischen Sonden Gam 42a und Bet 42a gegen Gamma- und Betaproteobakterien (Kap. 3.1.1). Bei Hybridisierungen mit paramagnetischen Partikeln konnten die neu entwickelten stammspezifischen Sonden ebenfalls nur eine geringere Menge an 23S-rRNA binden als die phylogenetischen Kontrollsonden (Kap. 3.1.2). Eine Ursache dafür kann die Ausbildung von Sekundärstrukturen der einzelsträngigen rRNA an den Positionen der Sondenbindung sein.

Die native Struktur der 16- und 23S-rRNA wurde kürzlich mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Yusupov *et al.*, 2001). Zudem haben Fuchs und Mitarbeiter (2001) eine Vielzahl von Sondenpositionen auf dem 23S-rRNA-Molekül von *E. coli* auf die Signalstärke nach einer Hybridisierung mit fluoreszierenden Sonden (FISH) untersucht und in Fluoreszenzklassen eingeordnet, bei der die Sekundärstruktur der rRNA entscheidend zur Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden beiträgt. Die Sondenpositionen der ersten selbst generierten Sonden (Tab. 3.1) wurden bei einem Vergleich mit den von Fuchs beschriebenen Sonden hauptsächlich den Klassen V und IV (0 bis 39 % relative Fluoreszenz) zugeordnet. Bei den anschließend generierten Sonden (Tab. 3.2) wurde daher auf eine Position mindestens in der Fluorezenzklasse III ( $\geq 40$  % relative Fluoreszenz) geachtet. Die phylogenetischen Sonden Gam 42a und Bet 42a waren in der Klasse II ( $\geq 60$  % relative Fluoreszenz) lokalisiert.

Eine höhere relative Fluoreszenz bei FISH musste in dieser Arbeit jedoch nicht zu einer verbesserten Bindung der Sonden führen, da nicht mit ganzen Zellen, sondern bereits extrahierter RNA ohne Ribosomen hybridisiert wurde. Die extrahierte Gesamt-RNA wurde vor der Anlagerung der Oligonukleotid-Sonden durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94°C denaturiert und die Sekundärstrukturen somit aufgebrochen. Zudem wurde in Gegenwart von 25 % Formamid hybridisiert, welches eine destabilisierende Wirkung auf die Wasserstoffbindungen zwischen den einzelnen Basen hat (Kilpper-Bälz, 1991). Dennoch ist während der Hybridisierung mit dem Oligonukleotid eine Konkurrenz der Sonden-Bindung mit der Selbstkomplementarität der einzelsträngigen 23S-rRNA möglich, die die Bindung der Sonde vermindert oder sogar verhindert. Daher mussten die verschiedenen Sonden direkt in einer DotBlot-Hybridisierung oder gleich in der Hybridisierung mit paramagnetischen Partikeln eingesetzt werden, um ihre Bindungseffizienz untereinander vergleichend zu überprüfen.

Aufgrund der jeweils detektierten geringen Hybridisierungseffizienz der generierten Sonden wurde in dieser Arbeit von ihrer weiteren Verwendung abgesehen und auf die von Manz (1992) beschriebenen phylogenetischen Sonden Gam 42a gegen Gammaproteobakterien und Bet 42a gegen Betaproteobakterien zurückgegriffen. So bestand die Möglichkeit, die 23S-rRNA der beiden *Pseudomonaden* MT1 und MT4 (MT4 nahm lediglich einen Anteil von 1.2 % ein) sowie die 23S-rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 aus der Gesamt-RNA des definierten Konsortiums im Chemostaten separat zu binden. In weiteren mikrobiellen Konsortien ist jeweils im Vorfeld zu überlegen, auf welche phylogenetischen Gruppen Schwerpunkte gelegt werden sollen und ob bereits optimierte Sonden für diese Gruppen beschrieben sind, um so von den beschriebenen Erfahrungen zu profitieren.

#### 4.1.2 Separation spezifischer rRNA-Moleküle

Nach der Auswahl der Sonden zur Detektion der dominanten Stämme im Chemostaten erfolgte ein weiterer Optimierungsschritt zur Separation spezifischer rRNA-Moleküle mittels verschiedener Hybridisierungsmethoden. Neben der Detektion von Nukleinsäuresequenzen wird die Hybridisierung zur spezifischen Abtrennung von markierten Zellen z.B. durch „cellsorting“ (Diez und Simm, 1998; Fuchs *et al.*, 2000 b) oder durch die Kopplung der Sonden an ein geeignetes Trägermaterial genutzt. Einige Kopplungsmethoden basieren auf Carbodiimid-vermittelte Anheftung der Oligonukleotide an Cellulose, Sephadex oder Sephacryl durch terminale Phosphatgruppen oder die Bindung von Nukleinsäuren an eine Polysaccharid-Matrix (Albretsen *et al.*, 1990). Der in dieser Arbeit genutzte optische Affinitätssensor der Firma BIACORE® AB (Schweden) verwendet eine carboxymethylierte Dextranoberfläche auf einem Sensorchip, die über eine Aktivierung mit N'-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) eine Kopplung mit den Aminogruppen von Proteinen wie z.B. Streptavidin ermöglicht (Johnsson *et al.*, 1991). So wurden biotinylierte Oligonukleotide auf dem Sensorchip gebunden und rRNA-Moleküle aus dem Gesamt-RNA-Gemisch im Zelldurchflussverfahren an der Chipoberfläche hybridisiert (Kap. 3.1.3).

Die einzelnen Fließzellen des genutzten Sensor-Chips CM5, in denen eine Hybridisierung in Echtzeit verfolgt werden kann, besitzen eine planare Bindungsfläche von 1 mm<sup>2</sup>, an die maximal 1 ng der Digoxigenin-markierten revers und komplementär aufgebauten Komplementär-Sonden angelagert wurde (Tab. 3.3). Experimente von Henze (2003) mit *in vitro* hergestellter mRNA gegenüber biotinylierten Sonden ergaben bei einem Einsatz von 6 µg mRNA zur Durchflusshybridisierung eine Bindung von 0.08 bis 0.33 ng mRNA je Fließzelle. Aus einem Gesamt-RNA-Gemisch konnte mit Hilfe spezifischer Sonden allerdings keine mRNA nachgewiesen werden (Henze, 2003). Die 23S-rRNA Moleküle aus dem Gesamt-RNA-Gemisch der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 wurden in dieser Arbeit zu etwa 0.3 ng pro Fließzelle und Hybridisierung gebunden (Tab. 3.4). Diese Anlagerung war jedoch nicht spezifisch, so dass sie mit Hilfe von Formamid-Konzentrationserhöhung im Hybridisierungspuffer hätte angepasst werden müssen, welches vermutlich zu einer geringeren 23S-rRNA-Bindung geführt hätte. Eine Temperaturerhöhung während der Hybridisierung wäre lediglich geringfügig durch vorgewärmte Puffer möglich gewesen. Ebenso ist die Regulierung der Durchflussmenge (50 – 100 µl) und Durchfluss-geschwindigkeit (1 – 10 µl min<sup>-1</sup>) nur in einem begrenzten Rahmen instrumentell vorgegeben, wobei langsamere Fließraten zu höheren Sensorsignalen führt (Henze, 2003).

Bei den experimentell ermittelten Bindungsmengen (Kap. 3.1.3) hätte die rRNA in mehr als 3000 Durchgängen eluiert, vereinigt und gefällt werden müssen, bis ausreichend Probemenge für eine einzelne Messung am EA-IRMS zur Verfügung gestanden hätte (Kap. 3.2). Aufgrund dieser Überlegungen ist die Abtrennung der rRNA am BIACORE<sup>®</sup>-Sensor für den präparativen Ansatz mit einer anschließenden Isotopenanalyse nicht geeignet, sondern sollte weiterhin zur vergleichenden Bindungsanalyse von Molekülen wie Antikörpern oder Proteinen genutzt werden.

Eine alternative Kopplung der Oligonukleotid-Sonden zu der planaren Oberfläche am Biacore-Sensor bietet die Bindung an kleine bewegliche Partikel. Paramagnetische Partikel (magnetic beads) eignen sich besonders für die Separation von Molekülen, da sie im magnetischen Feld leicht von ungebundenen Molekülen abgetrennt werden können. Die Partikel sind mit unterschiedlichen Oberflächenbeladungen kommerziell erhältlich und finden eine breite Anwendung im medizinischen, aber auch umweltbiologischen Bereich (Albretsen *et al.*, 1990; Haukanes und Kvam, 1993; Tebbe *et al.*, 1995; Stoffels *et al.*, 1999).

Die Hybridisierung der 23S-rRNA der Stämme *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 wurde zunächst mit Oligonukleotid-Sonden durchgeführt, welche kovalent über eine Kette von sechs Kohlenstoffatomen mit den paramagnetischen Partikeln (Beads) verbunden waren (Kap. 3.1.2). Diese Kopplung wurde gewählt, um nicht zusätzlich Proteine in die Hybridisierung einzutragen, welche bei einer Elution den Isotopenwert der separierten rRNA verfälschen könnten. Es zeigte sich jedoch, dass die indirekte Bindung der Beads über Streptavidin an eine biotinylierte Oligonukleotid-Sonde nach der Hybridisierung der Sonde mit der 23S-rRNA durch größere eluierte rRNA-Mengen gekennzeichnet war als die Hybridisierung mit direkt an die Beads gebundenen Oligonukleotid-Sonden (Kap. 3.1.2, Abb. 3.3). Eine verbesserte rRNA-Separation mit den kleineren Beads könnte durch sterische Behinderungen der Hybridisierung durch die direkt gebundenen größeren paramagnetischen Partikel erklärt werden.

Bei der indirekten Bindung erfolgte die Hybridisierung mit dem Oligonukleotid, welches lediglich mit Biotin (0.24 kDa) verbunden war. Die Bindung an die mit einem mit dem Durchmesser von 0.7 bis 1.8  $\mu\text{m}$  um ein Vielfaches größeren Streptavidin-gekoppelten Beads erfolgte erst nach der Hybridisierung. Für eine bessere Eignung der kleineren Partikel spricht, dass die größeren SAV2-Beads (1.8  $\mu\text{m}$  Durchmesser) auch bei der indirekten Kopplung weniger rRNA binden können als die mit einem Durchmesser von 0.7  $\mu\text{m}$  kleineren SAV1-Beads (Abb. 3.3), bei denen das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen größer ist und damit auch die Bindungsmöglichkeiten zu den rRNA-Molekülen erhöht sind. Für die Hybridisierungen mit <sup>13</sup>C-markierten rRNA-Molekülen ist daher die indirekte Kopplung mit den kleineren SAV1-Beads nach einer Hybridisierung mit Biotin-markierten Oligonukleotid-

Sonden zur Separation spezifischer rRNA-Moleküle besser geeignet als eine Separation mit den größeren indirekt oder direkt gebundenen SAV2-Beads.

#### 4.1.3 Analyse stabiler Isotope am Isotopenmassenspektrometer (IRMS)

Ein großer Vorteil der Isotopenmassenspektrometrie gegenüber klassischer analytischer MS-Technik (GC-MS und LC-MS) ist die hohe Präzision in der Analyse unterschiedlicher Isotopenverhältnisse, die bei  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  mit  $10^{-5}$  atom% bestimmt werden kann (Meier-Augenstein, 1997). Die benötigte Menge der zu analysierenden Probe am IRMS ist jedoch im Vergleich zur Sensitivität eines modernen GC-MS (bis fmol) relativ hoch. Sie liegt bei der gekoppelten GC-C-IRMS Analyse im nano- oder picomol-Bereich, am EA-IRMS bei etwa 1  $\mu\text{mol}$  (Fry *et al.*, 1996). Jedoch ist der Nachweis einer Komponente am GC-MS zur Analyse ihrer Herkunft und ihrer Synthese- und Abbaurate (Turnover) meist unzureichend, was mit Hilfe der Isotopenmassenspektrometrie bei unterschiedlich angereicherten Ausgangsverbindungen möglich ist.

Die direkte Verbindung zwischen gaschromatographischer Trennung und Isotopenanalyse (GC-C-IRMS) fügt einen Separationsschritt und eine Qualitätskontrolle der analysierten Probe (z.B. mit einem GC-MS) ein. Bei Makromolekülen, die gaschromatographisch nicht aufgetrennt werden können, muss der Kohlenstoffgehalt der gesamten Probe im Elementaranalysator ohne weitere Separationen und Kontrollen verbrannt werden und wird zur Isotopenanalyse ans IRMS weitergeleitet (Kap. 2.12.1). Für die Analyse einer Probe am EA-IRMS sind daher die Quantität, die Qualität und die Aussagekraft in Bezug auf mögliche Isotopenfraktionierung und kinetische Faktoren beim Isotopeneinbau in die analysierten Makromoleküle von großer Wichtigkeit (Abb. 4.1).

Die Faktoren, welche auf die Isotopenmessung eines Biomoleküls am EA-IRMS Einfluss nehmen können und daher näher untersucht wurden, sind in Abb. 4.1 dargestellt. Die Quantität der Probe, die für eine Analyse im linearen Messbereich des EA-IRMS eingesetzt werden musste, wurde mittels  $^{13}\text{C}$ -unmarkierter und markierter Biomoleküle ermittelt. Die Qualität der Probe wurde in Bezug auf gleiche Biomoleküle anderer Stämme, wie bei rRNA-Messungen die rRNA anderer Bakterien, oder anderer Biomoleküle der gleichen und anderer Stämme (z.B. Proteine in rRNA-Proben) überprüft. Zudem können kohlenstoffhaltige Verbindungen durch die Extraktion, Separation oder Aufarbeitung der Biomoleküle in die Probe eingetragen werden, wie z.B. Pufferbestandteile während der Hybridisierung zur Trennung von spezifischer 23S-rRNA. Zusätzlich kann eine Isotopenfraktionierung in der Biosynthese oder während der Separation der analysierten Biomoleküle auftreten, welche die Aussagekraft der Isotopenanalyse des Moleküls nach einem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment vermindert (Abb. 4.1).

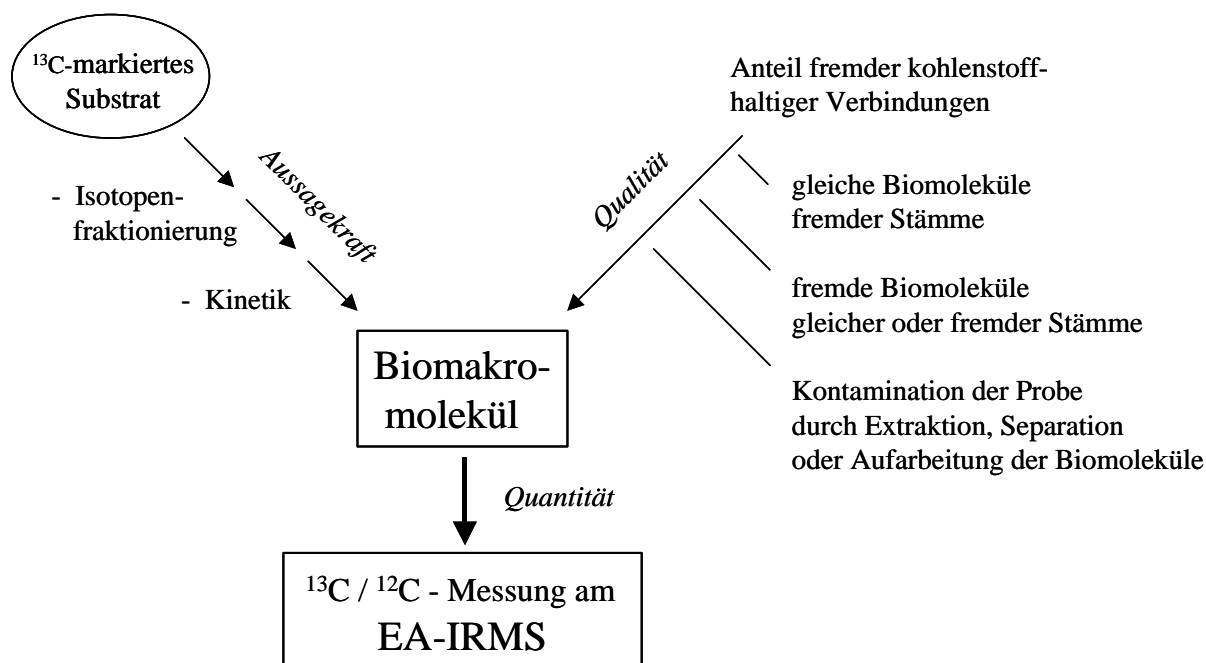


Abb. 4.1.: Faktoren, die auf die Messung des Isotopenwertes eines Biomoleküls am EA-IRMS Einfluss nehmen. Isotopenfraktionierungen sowie die Kinetik des Kohlenstoff-Einbaus können die Aussagekraft der Isotopenwerte von Biomolekülen nach Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat beeinflussen. Die Qualität der Probe kann durch Kontaminationen anderer kohlenstoffhaltiger Verbindungen verringert werden und wie die Quantität der Probe die am EA-IRMS gemessenen Isotopenwerte der Biomoleküle verändern.

Die Quantität der zu analysierenden Biomoleküle, wie die aus der Gesamt-RNA separierte rRNA, war bereits in vorangegangenen Studien am EA-IRMS ein kritischer Faktor (MacGregor *et al.*, 2002). Daher wurde zunächst das Detektionslimit des Isotopenmassenspektrometers in Kombination mit dem Elementaranalysator ermittelt. MacGregor und Mitarbeiter (2002) benötigten für die Isotopenanalyse von separierter rRNA einer unmarkierten Probe eine Mindestmenge von 10 - 100  $\mu\text{g}$  RNA. Da für diese Messungen sowohl ein anderer Elementaranalysator als auch ein anderes IRMS als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, konnte diese Angabe nur als Anhaltspunkt dienen und musste für die gegebenen Instrumente verifiziert werden. Anhand von unmarkierten rRNA-Proben wurde zunächst der Zusammenhang zwischen der Signalstärke am EA-IRMS und dem gemessenen Isotopenwert ermittelt (Abb. 3.5). Eine Messung mit Standardabweichungen von 0.6 ‰ wurde ab der analysierten Menge von 1  $\mu\text{g}$  rRNA beobachtet, was einer Kohlenstoffmenge von etwa 350 ng entspricht. Bei  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Proben konnte schon mit einer Menge von 100 ng Acetat, dem 40 ng Kohlenstoff und 100 ng RNA entsprechen, eine deutliche Isotopenmarkierung am EA-IRMS gegenüber der unmarkierten Probe gemessen werden. Das durch die Markierung erwartete Isotopenverhältnis von 100 ‰ gegenüber dem Standard PDB (Kap. 1.1.2) wurde jedoch erst bei einer analysierten Menge von 2.5  $\mu\text{g}$  Acetat, also 1  $\mu\text{g}$  Kohlenstoff, angegeben (Abb. 3.6), entsprechend einer Menge von 2.8  $\mu\text{g}$  RNA.



Dieses Ergebnis zeigt, dass zum Nachweis einer Isotopenmarkierung in der rRNA eine Menge von 100 ng ausreichend war. Für eine genaue Analyse der Isotopenverhältnisse mussten 2.8 µg rRNA pro Messung am EA-IRMS eingesetzt werden. Als Richtgröße diente in den folgenden Messungen die Signalstärke am EA-IRMS, welche 20 mV überschreiten musste (Abb. 3.6). Zur Vergrößerung der Probenmenge bei der Analyse von geringen Mengen hoch  $^{13}\text{C}$ -angereicherter Proben ist die Zugabe eines genau definierten Anteils einer unmarkierten kohlenstoffhaltigen Verbindung mit bekanntem Isotopenwert möglich, dessen Isotopenwert anschließend mittels einer Massenbalance wieder herausgerechnet wird (Dube *et al.*, 1998; Manefield *et al.*, 2002 a und b). Da geringe Isotopenanreicherungen in der Probe aber so nicht mehr detektiert werden könnten, wurde die „Isotopenverdünnung“ in dieser Arbeit nicht angewendet.

Ein großer Vorteil der Separation von rRNA-Molekülen mittels Oligonukleotid-Sonden besteht darin, dass in einem bakteriellen Konsortium auch ein Großteil der nicht kultivierten Stämme erfasst wird und je nach Wahl der Sonden mit unterschiedlicher Trennschärfe die phylogenetische Gruppierung der rRNA gewährleistet ist. Die Spezifität der separierten rRNA wird durch die gewählten Sonden und Hybridisierungsbedingungen sichergestellt. Mittels Hybridisierungen mit Oligonukleotid-Sonden in definierten Mischungen aus  $^{13}\text{C}$ -markierter und unmarkierter Gesamt-RNA verschiedener Stämme wurde die Spezifität der Sonden Gam 42a und Bet 42a gegenüber den Stämmen *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 überprüft (Abb. 3.9). Hier war es möglich, aus 300 ng markierter Gesamt-RNA gegenüber 4.1 µg bzw. 5.6 µg unmarkierter Gesamt-RNA die Isotopenmarkierung in der separierten rRNA nachzuweisen, was einem Anteil von 5 - 8 % entsprach (Kap. 3.3.1). Die sinkenden Isotopenwerte der rRNA bei niedrigeren Anteilen der markierten rRNA im Gemisch waren bedingt durch die geringen Mengen der separierten rRNA (siehe oben).

Das EA-IRMS misst den Isotopenwert des gesamten Kohlenstoffs einer Probe, die mit dem Zinn- oder Silbertiegel verbrannt wird (Kap. 2.12.1), was besonders hohe Anforderungen an die Qualität der Probe stellt. Im Gegensatz zum durchgeführten Experiment, bei dem zur Überprüfung der Spezifität der Hybridisierung gezielt fremde Moleküle markiert oder unmarkiert eingesetzt werden konnten (Kap. 3.3.1), ist eine Kontamination durch fremden Kohlenstoff, welcher durch die Hybridisierung in die Elutionslösung mit der rRNA eingetragen werden konnte, schwieriger zu bestimmen. Um den Effekt von Kontaminationen auf sehr geringe Probemengen abzuschätzen, wurden mehrere Experimente durchgeführt.

Die Zugabe einer Elutionslösung ohne rRNA zu geringen Mengen (0.25 – 1.5 µg) einer  $^{13}\text{C}$ -markiertem Acetat-Probe, welche am EA-IRMS lediglich ein Signal von 6 bis 16 mV ergaben, führte bei einer Zunahme des Signals um jeweils 8 bis 10 mV zu einer Verringerung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwerts der Probe (Abb. 3.10). Mittels Massenbalancen wurde der prozentuale

Anteil jeder möglichen kohlenstoffhaltigen Verbindung aus der Hybridisierungslösung errechnet, welcher die Isotopenverschiebung bewirkt haben konnte (Tab. 3.5). Bei Verbindungen mit geringem  $^{13}\text{C}$ -Gehalt (z.B.  $-34\text{‰}$  gegenüber PDB) mussten etwa  $0.14\text{ }\mu\text{g}$  zu der Probe von  $0.25\text{ }\mu\text{g}$  Acetat gegeben worden sein. Bei Probenmengen von  $1.5\text{ }\mu\text{g}$  Acetat hätten durchschnittlich  $33\text{ }\%$  unmarkierter Kohlenstoff (ca.  $0.5\text{ }\mu\text{g}$ ) die gemessenen Isotopenverschiebungen bewirkt. Diese Menge spricht jedoch gegen die gemessene Signalerhöhung von etwa  $10\text{ mV}$ , entsprechend  $0.2\text{ }\mu\text{g}$  Kohlenstoff. Die Identifikation des unmarkierten Kohlenstoffs konnte durch mehrere Analysen eingegrenzt werden.

Mittels unterschiedlicher Proteinnachweise und MALDI-MS-Messungen, bei denen das Detektionsminimum einer Komponente unterhalb von  $1\text{ ng}$  liegt, wurde das Vorkommen von Proteinen sowie einzelner Aminosäuren ausgeschlossen, welche über die Streptavidin-Biotin-Kopplung der zur Hybridisierung genutzten Oligonukleotide oder durch die RNA-Extraktion aus den Zellen in die Probe eingetragen werden konnten (Kap. 2.8 und Kap. 3.3.2). In einigen der am MALDI-MS analysierten Elutionslösungen wurden Massen mit geringer Intensität detektiert, die jedoch keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden konnten. Auch das Vorkommen von unzureichend abgetrennten paramagnetischen Partikeln wurde so ausgeschlossen. Zudem führten verschiedene RNA-Aufreinigungsmethoden einer markierten 23S-rRNA-Probe lediglich zu einer Abnahme der Probemenge und damit zu einer Verringerung der Isotopenwerte und zunehmenden Messabweichungen am EA-IRMS (Kap. 3.3.2).

Wie in den zuvor gemachten Analysen war die Probemenge zur Messung der Isotopenwerte am EA-IRMS entscheidend, da sich bei Proben mit geringen Signalstärken der Einfluss der konstant geringen Menge an Kontamination bemerkbar machte, bei größeren Probemengen aber vernachlässigt werden konnte. Für alle folgenden Messungen wurden daher nur Proben mit einer Signalstärke am EA-IRMS von  $20\text{ mV}$  (siehe oben) als minimale Probemenge berücksichtigt.

#### **4.1.4 Anforderungen an Biomarker-Moleküle für die Isotopenanalyse**

Die Aussagekraft der Isotopenwerte bestimmter Biomarker-Moleküle kann - wie in Abb. 4.1 dargestellt - durch Isotopenfraktionierungen und die Kinetik verschiedener Stoffwechselwege beim Einbau des stabilen Isotops beeinflusst werden. Bei der Isotopenfraktionierung kommt es zu einer bevorzugten Bindung oder Umsetzung von einem, meist dem leichteren, Isotop. Sie kann durch alle Manipulationen der Moleküle vor der Isotopenanalyse wie der Separation, Derivatisierung und Wechselwirkungen mit stationären Phasen ausgelöst werden (Hayes, 2001). Durch geringe Unterschiede in der Bindungsstärke zwischen leichtem und schwerem Kohlenstoff sind unterschiedliche Reaktionsraten möglich (Melander und Saunders, 1980).

Geringe Fraktionierungen in der Aufarbeitung von Proben wurden während der Derivatisierung von Aminosäuren festgestellt (Silfer *et al.*, 1991); in den übrigen chemischen Umwandlungen sind sie zu vernachlässigen (Meyer-Augenstein, 1997). Enzymatische Isotopendiskriminierungen in der Biosynthese von Molekülen sowie unterschiedliche Stoffflüsse in der Zelle können dagegen größere Auswirkungen haben und werden im folgenden für alle in dieser Arbeit analysierten Biomoleküle diskutiert.

Die möglichen Fraktionierungen der Isotope  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$  in Biosynthese-Prozessen von Biomolekülen wie Aminosäuren, Fettsäuren und Nukleinsäuren gegenüber der Biomasse wurden bereits 1961 in Bezug auf die Biosynthese verschiedener Aminosäuren erkannt (Abelson und Hoering) und sind von Hayes (2001) ausführlich zusammengestellt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isotopeneffekte in den später untersuchten Biomolekülen anhand der im Chemostaten dominanten Bakterien *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 analysiert, die mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat in Batch-Kulturen gewachsen sind (Kap. 3.4).

Die Neusynthese von Fettsäuren erfolgt in der Zelle aus Acetyl-Coenzym A-Einheiten, welche zum großen Teil durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat durch den glykolytischen Abbau von Kohlenhydraten gebildet werden (Stryer, 1995). Die Acetyl-Reste werden in einem Multienzymkomplex, welcher bei *Escherichia coli* aus 7 leicht dissoziierbaren Enzymen besteht, zur langkettigen, gesättigten Palmitinsäure C16:0 verbunden. Anschließend erfolgen weitere Modifikationen wie die Verlängerung der Kohlenstoffkette sowie die Einführung von Doppelbindungen oder Methylgruppen durch weitere Enzyme (Nelson und Cox, 2001).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 hatte die Palmitinsäure einen Anteil in der Phospholipid-Fraktion von 40 % bis 55 % (Tab. 3.8), in den Glykolipiden von 20 % bis 30 %. Laut einer Studie von Zelles und Mitarbeitern (1992) sind die Isotopenwerte der Phospholipid-Fettsäuren ähnlich dem Wert der Fettsäure C16:0 der Phospholipide, was jedoch in anderen Studien nur begrenzt bestätigt werden konnte. Abraham und Mitarbeiter (1998) haben eine Vielzahl von Stämmen auf die natürlichen Isotopenwerte der Fettsäuren von Phospho- und Glykolipiden untersucht. Neben der generellen Tendenz, gegenüber der Palmitinsäure verringerte Isotopenwerte in der Fettsäure C14:0 und angereicherte Werte in C18:0 zu erhalten, wurden sowohl substratspezifische als auch stammspezifische Unterschiede gemessen. Es ist daher wichtig, die unterschiedlichen Isotopenanreicherungen in den Fettsäuren der in dieser Arbeit gewählten Bakterien zu überprüfen.

Bei allen Markierungsexperimenten waren die Isotopenwerte der Palmitinsäure der Phospholipide im Vergleich zur Biomasse sehr hoch (Tab. 3.7 und Tab. 3.8). Insgesamt waren alle Fettsäuren der Phospholipide mit dem schweren Isotop angereichert. In den untersuchten Stämmen *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 wurden die zyklischen Fettsäuren C17:0d7,8cy und C19:0d8,9 sowie die Palmitinsäure C16:0 am stärksten angereichert, während die gesättigte Fettsäure C18:0 den geringsten Einbau des stabilen Isotops zeigte, was möglicherweise durch die Kettenverlängerung mit  $^{13}\text{C}$ -armen Acetyl-CoA durch eine Acetyltransferase bewirkt wurde. Insgesamt zeigten beide Stämme bei Wachstum mit  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat innerhalb der Isotopenwerte der Phospholipid-Fettsäuren nur geringe Unterschiede und hohe Anreicherungen, so dass alle Fettsäuren für den Nachweis der Substrataufnahme geeignet sind.

Dagegen wurde in allen Experimenten eine geringe bzw. fehlende Anreicherung mit dem stabilen Isotop in den Fettsäuren der Glykolipide gemessen. Diese Beobachtung wurde bereits in vorigen Experimenten gemacht (Hermann, 1999; Abraham und Pelz, persönliche Mitteilungen). Obgleich  $^{13}\text{C}$  bereits zu Beginn des Wachstums in der Batchkultur in der Mischung  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Acetat:Acetat im Verhältnis von 1:200 enthalten und Acetat die einzige verfügbare Kohlenstoffquelle war, wurde es lediglich in Spuren in die Glykolipid-Fettsäuren aufgenommen. Dass die Fettsäuren der Glykolipide aller Zellen bereits zuvor im Vollmedium der Vorkultur synthetisiert werden konnten, ist bei der starken Vervielfältigung der Zellzahl im Minimalmedium unwahrscheinlich (Kap. 3.4). Die Diskrepanz zwischen den Isotopenwerten der Fettsäuren von Phospho- und Glykolipiden lässt sich möglicherweise mit einer sehr langsamen Syntheserate der Glykolipide erklären. Im Stoffwechsel der Zelle ist es trotzdem unwahrscheinlich, dass die Fettsäuren, die in beiden Lipidfraktionen vorkommen, wie z.B. C16:0 und C18:0, auf unterschiedliche Weise synthetisiert werden. Möglicherweise werden bei diesen Fettsäuren aus einem gemeinsamen Pool zur Synthese der Glykolipide selektiv nur die  $^{13}\text{C}$ -armen Fettsäuren gewählt. Modifikationen zu den übrigen Fettsäuren der Glykolipide gehen dann von diesen Fettsäuren aus. Zudem können vor der Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat synthetisierte Fettsäuren zum Aufbau neuer Glykolipide verwendet werden. Festzuhalten bleibt, dass die Fettsäuren der Glykolipide die Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat in dem gemessenen Zeitrahmen (in Batch-Kulturen über 24 h, beim Aufwuchs der PCB-Biofilm 5 Wochen nach der  $^{13}\text{C}$ -Markierung) nur geringfügig widerspiegeln und daher als Biomarker-Moleküle nach einem Markierungsexperiment nicht geeignet sind, während der Einbau des Substrats in die einzelnen Fettsäuren der Phospholipide innerhalb von 1 h so schnell erfolgt wie in die gesamte Biomasse der Zelle.

Die Aminosäuren können mit Ausnahme von D-Alanin und Diaminopimelinsäure, die lediglich in der Zellwand von Bakterien vorkommen (Pelz *et al.*, 1998), nicht als Biomarker-Moleküle genutzt werden, da sie Bestandteil aller Organismen sind. Biomarker-Funktionen

besitzen jedoch spezielle Proteine, die vor der Isotopenanalyse der einzelnen Aminosäuren zum Beispiel durch Immunocapture getrennt werden müssen (Pelz *et al.*, 1999). Zusätzlich ist die Biosynthese von Aminosäuren zum Teil mit einer enzymatischen Isotopendiskriminierung verbunden (Hayes, 2001), so dass sie in dieser Arbeit lediglich zur Dokumentation der Aufnahme des stabilen Isotops in die Biomasse nach einem Markierungs-Experiment analysiert wurden. Einige Aminosäuren dienen jedoch in der Biosynthese von Nukleinsäuren als Vorläufermoleküle zu den einzelnen Basen und sollen daher gesondert betrachtet werden. Die Pyrimidin-Basen enthalten C-Atome aus der Asparaginsäure und Tetrahydrofolat (THF), einem Cofaktor für die Biosynthese von Glycin, während die Purin-Basen aus den C-Atomen von Glycin und THF bestehen (Buddecke, 1994). In natürlichen Isotopenverhältnissen werden leichte Anreicherungen in den Pyrimidin-Basen und Abnahmen der Isotopenwerte in den Purin-Basen gegenüber der Biomasse vorausgesetzt (Hayes, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl in der Aminosäure Glycin als auch in der Asparaginsäure stets eine ähnliche Isotopenanreicherung gemessen wie in der Gesamt-Biomasse (Abb. 3.20) und somit keine Isotopenfraktionierung detektiert.

Erste Isotopenmessungen von gesamten Nukleinsäuren, die neben Basen und einer Phosphat-Gruppe auch aus einem C<sub>5</sub>-Zucker (Ribose oder Desoxyribose) bestehen, haben Blair und Mitarbeiter (1985) sowie Coffin und Mitarbeiter (1990) durchgeführt. In beiden Studien wurde mit natürlichen Isotopenverteilungen in den Nukleinsäuren keine Abnahme des Isotopenwertes gegenüber der Biomasse nachgewiesen. Créach und Mitarbeiter (1997) untersuchten die Isotopenverteilung in den Nukleinsäuren verschiedener Bakterienstämme, wobei die Isotopenwerte der Nukleinsäuren gegenüber der Biomasse im Medium mit Trypton leicht mit <sup>13</sup>C angereichert, die Isotopenwerte mit Glucose als Substrat dagegen um  $\Delta\delta = -1.3\text{ ‰}$  gegenüber der Biomasse geringer waren. Eine ähnliche Beobachtung machten MacGregor und Mitarbeiter (2002), bei der die Gesamt-RNA von *E. coli* beim Wachstum mit Glucose dem Isotopenwert der Biomasse angepasst war, mit Acetat aber eine Abnahme des <sup>13</sup>C-Gehalts von durchschnittlich  $\Delta\delta = -1.2\text{ ‰}$  gegenüber dem Kohlenstoff der gesamten Zelle gemessen wurde. Die Isotopeneffekte bei natürlichen Isotopenverteilungen sind folglich, wie bei den Fettsäuren, durch unterschiedliche Abbau- und Synthesewege abhängig vom gewählten Substrat sowie stammspezifisch.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor und nach einer [U-<sup>13</sup>C]-Markierung in allen extrahierten Ribonukleinsäuren eine geringere Isotopenanreicherung gemessen als in der Biomasse. Diese Differenz wurde mittels eines Fraktionierungsfaktors  $\varepsilon$  beschrieben (Kap. 3.4), welcher normalerweise für natürliche Isotopenwerte errechnet wird (Hayes, 1993 und 2001; Abraham *et al.*, 1998) und hier sowohl in Reinkulturen (Tab. 3.7) als auch innerhalb des mikrobiellen Konsortiums in den Chemostaten zwischen der Biomasse und Gesamt-RNA ermittelt wurde (Abb. 3.19). Besonders die zeitliche Veränderung der Fraktionierung deutet auf die

langsamere Syntheserate der RNA hin. Die RNA inkorporiert geringere Mengen des stabilen Isotops als die Gesamt-Biomasse, welche bereits durch die Aufnahme des Substrats in die bakteriellen Zellen eine hohe Anreicherung mit  $^{13}\text{C}$  aufweist. In der Zelle muss das Substrat zunächst in einfache, weiterverwendbare Verbindungen wie Acetyl-Reste zersetzt und für den Grundstoffwechsel zur Verfügung gestellt werden. Ein Teil des Substrats wird in der Zelle zur Energiegewinnung genutzt und verlässt sie in Form von  $\text{CO}_2$ . Die Ribonukleinsäuren werden, wie oben erwähnt, aus Aminosäuren und Ribose-Zuckern synthetisiert. Wahrscheinlich werden jedoch einzelne Nukleotide beim Aufbau der RNA nicht aus neuen, sondern aus bereits zuvor synthetisierten Aminosäuren gebildet. Nukleoside, Nukleotide und Basen können wiederverwendet oder von außen aufgenommen werden, was bei Prokaryoten hauptsächlich in *E. coli* untersucht (Neuhard und Kelln, 1996; Saxild *et al.*, 1996), aber auch in anderen Bakterien beobachtet wurde (Martinussen und Hammer, 1995; Winkler *et al.*, 1999; Macfadyen *et al.*, 2001). Dadurch wird die Einbaurate des schweren Isotops in die Gesamt-RNA nach Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat weiter verlangsamt. Insgesamt nimmt die Differenz zwischen dem Isotopenwert der Biomasse und der RNA-Moleküle ab, je geringer die Isotopenmarkierung ausfällt und je länger sich das markierte Substrat im Medium befindet (Tab. 3.7 und Abb. 3.19).

Bei allen Messungen der RNA am EA-IRMS konnten geringe Mengen unmarkierter Kontaminationen nicht ausgeschlossen werden, welche durch die RNA-Extraktion in die Probe eingetragen werden konnten (Kap. 4.1.3). Da in vorangegangenen Experimenten der Bereich bestimmt wurde, in dem der Isotopenwert der RNA reproduzierbar gemessen werden konnte und am EA-IRMS Mengen mit Signalen von 30 – 50 mV an Gesamt-RNA analysiert wurden, konnte die Beeinflussung durch Kontaminationen vernachlässigt werden. Parallel dazu wurde auch in den Fettsäuren der Glykolipiden eine noch geringere Isotopenanreicherung als in der RNA gemessen, wobei hier mittels GC-MS die Qualität der Probe zweifelsfrei überprüft werden konnte.

Wahrscheinlich erfolgt während der Synthese der rRNA-Moleküle eine Isotopenfraktionierung oder es bestehen kinetische Einflüsse in der Biosynthese zwischen dem sehr viel größeren Anteil des unmarkierten Substrats und der geringen Menge an  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat bzw. deren Abbauprodukten, welche in allen Markierungsexperimenten mit RNA-Analysen zu berücksichtigen sind.

## 4.2 Isotopenmarkierung des definierten bakteriellen Konsortiums im Chemostaten mit [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Faktoren diskutiert, die bei der Interpretation von Isotopenwerten nach einer Analyse von Biomarker-Molekülen wie rRNA am EA-IRMS zu beachten sind. Durch diese Studien wurden die Voraussetzungen geschaffen, um die Isotopenmarkierung in einem mikrobiellen Konsortium anzuwenden.

Das mikrobielle Konsortium in kontinuierlicher Kultur bestehend aus vier Stämmen wurde bereits vor Jahren als Modell-Gemeinschaft zum Abbau von 4-Cl-Salicylat etabliert (Kap. 1.2.1). Vorangegangene Experimente mit *Pseudomonas* sp. MT1 in Batch-Kulturen zeigten während des exponentiellen Wachstums mit 4-Cl-Salicylat eine erhöhte Konzentration von 4-Cl-Catechol im Zellüberstand (Pelz, 1999). Wuchs dagegen das mikrobielle Konsortium bestehend aus den Stämmen *Pseudomonas* sp. MT1 und MT4, *Achromobacter* sp. MT3 und *Empedobacter* sp. MT2 mit 4-Cl-Salicylat, wurden geringere Konzentrationen 4-Cl-Catechol detektiert und es konnten zudem höhere Konzentrationen von 4-Cl-Salicylat metabolisiert werden (Pelz, 1999). Die Abnahme der 4-Cl-Catechol-Konzentration in der bakteriellen Gemeinschaft zeigt den Abbau durch einen oder mehrere der übrigen Stämme im Konsortium, was in dieser Arbeit mittels [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol überprüft wurde.

Während des Chemostatenwachstums mit 4-Cl-Salicylat wurden mittels HPLC die Konzentrationen weiterer möglicher Abbauprodukte wie Catechol, trans- und cis-Dienlacton, Maleyl- und cis-Acetyl-Acrylat, Protoanemonin und photometrisch von Hydroxymuconsäure-semialdehyd (HMSA) überwacht (Kap. 2.2 und 3.5). Lediglich die HMSA-Konzentration nahm nach der Puls-Markierung mit [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol geringfügig zu (Abb. 3.13). HMSA ist ein toxisch wirkendes Metabolit, welches durch die Meta-Spaltung von Cl-Catechol (Wieser *et al.*, 1994) oder Catechol durch die Aktivität einer Catechol-2,3-Oxygenase entsteht, einem Enzym, das erstmals von Nozaki und Mitarbeitern (1963) aus dem Stamm *Pseudomonas putida* kristallisiert wurde. Eine Akkumulation von HMSA erfolgte aber nur bis zu einer Konzentration von 0.03 mM und hatte bei den geringen Verdünnungsraten von 0.08 D<sup>-1</sup> keine negativen Auswirkungen auf die optische Dichte der Kultur oder die weitere Substratdegradation durch die mikrobielle Gemeinschaft.

Der immunologische Nachweis der Bakterien im Chemostaten, entwickelt von Faude (1995) und optimiert von Frech (1996), ermöglichte bereits in vorangegangenen Studien die Bestimmung ihrer prozentualen Verteilung, welche in einer stabilen Gemeinschaftsstruktur Hinweise auf funktionelle Interaktionen geben kann. Der dominante Stamm in der kontinuierlichen Kultur mit 4-Cl-Salicylat als einziger Kohlenstoffquelle war in allen vorangegangenen Kulturen sowie in dieser Arbeit *Pseudomonas* sp. MT1 mit etwa 75 bis

80 % aller Bakterienzellen. *Achromobacter* sp. MT3 (ehemals *Alcaligenes*, Yabuuchi *et al.*, 1998) nahm in den vorangegangenen kontinuierlichen Kulturen bei 12°C genau wie *Pseudomonas* sp. MT4 etwa 8 % aller Zellen ein und wurde in dieser Studie bei 30°C mit etwa 20 % der zweitwichtigste Stamm in der Gemeinschaft. Die Abundanz von *Pseudomonas* sp. MT4 war hier auf lediglich 1 % der Gemeinschaft abgesunken, was möglicherweise durch die höheren Temperaturen bewirkt wurde. Ebenso wurden von Rabenau (persönliche Mitteilungen) ähnliche Veränderungen in der Gemeinschaftsstruktur zwischen den Kulturen bei 12°C und 30°C beobachtet, bei denen der Anteil von *Achromobacter* sp. MT3 bei höheren Temperaturen von 16 % auf 19 % zunahm und der von *Pseudomonas* sp. MT4 von 7 % auf 3 % abnahm. Die Abundanz des Stammes *Empedobacter* sp. MT2 konnte in Studien von Frech (1996) durch einen Substratwechsel von 4-Cl-Salicylat auf ein Vollmedium von 1 % auf maximal 60 % und nach erneutem Wechsel zurück auf 1 % moduliert werden. Aufgrund seines geringen prozentualen Vorkommens in der Gemeinschaft mit 4-Cl-Salicylat als Substrat und da die Phospholipid-Fettsäuren nach Zugabe von <sup>13</sup>C-markiertem 4-Cl-Catechol nicht angereichert waren, wurde ihm keine entscheidende Rolle bezüglich der direkten Substratverwertung zugesprochen (Pelz *et al.*, 1999). Trotzdem konnte er sich über Monate in der kontinuierlichen Kultur mit einem stabilen Prozentsatz von 1 bis 2 % behaupten (Kap. 3.5) und ernährt sich vermutlich nekrophag von organischen Verbindungen der übrigen drei Stämme.

Die Markierung mit [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol konnte die Metabolisierung und den Einbau des Substrats in die Aminosäuren, Fettsäuren und Ribonukleinsäuren dokumentieren und Hinweise auf die Bakterien geben, welche 4-Cl-Catechol aufnehmen und abbauen. Die von Pelz und Mitarbeitern (1999) genutzte Möglichkeit zur Bestimmung der Isotopenwerte der Palmitinsäure der verschiedenen Stämme wurde durch die Trennung der Stämme vor der Extraktion mittels Immunocapture ermöglicht. Für diesen Ansatz müssen jedoch spezifische Antikörper zur Verfügung stehen, was für Bakterien, welche nicht im Labor kultiviert werden konnten, problematisch ist. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt und stattdessen die rRNA extrahiert, mittels Hybridisierung separiert und auf ihren Isotopeneinbau analysiert. Zusätzlich wurden die Isotopenwerte der Aminosäuren und der Gesamt-Fettsäuren bestimmt.

In den Fettsäuren der Phospholipide wurden nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol sehr hohe Isotopenanreicherungen gemessen, aber durch das Vorkommen der gleichen Fettsäuren war keine Unterscheidung zwischen den Stämmen *Pseudomonas* sp. MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 möglich (Tab. 3.9). Der Stamm *Empedobacter* sp. MT2 verfügte dagegen über eine Vielzahl kurzkettiger Biomarker-Fettsäuren und die Fettsäure C20:1ω9 wurde nur von *Pseudomonas* sp. MT4 synthetisiert. Diese charakteristischen Fettsäuren konnten jedoch im Chemostaten aufgrund des geringen prozentualen Anteils der beiden Stämme von jeweils 1 - 2 % (Kap. 3.5.1) nicht detektiert werden, so dass auch keine



Isotopenanalyse erfolgen konnte. Die extrahierten Aminosäuren verhielten sich ähnlich wie die Phospholipid-Fettsäuren. Die hohen  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen in diesen Biomolekülen (Abb. 3.21) erlaubten zwar keinerlei Hinweise auf die beteiligten Stämme, aber bestätigten nicht nur die Aufnahme, sondern auch den Einbau des Kohlenstoffs in die Zellkomponenten.

Die Separation stammspezifischer Nukleinsäuren mittels Oligonukleotid-Sonden ermöglichte dagegen die Unterscheidung der beiden dominanten Stämme *Pseudomonas* MT1 und *Achromobacter* MT3. Nach der Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  zu den definierten mikrobiellen Gemeinschaften wurde im ersten Chemostaten keine Anreicherung in der separierten 23S-rRNA über den Zeitraum von 3 h gemessen (Abb. 3.22), welche möglicherweise bei späteren Probenahmen durch den langsamen Einbau in die rRNA auch in der 23S-rRNA von *Pseudomonas* sp. MT1 sichtbar gewesen wäre. Die Analysen wurden jedoch 3 h nach der Markierung nicht weiter fortgesetzt, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine deutliche Abnahme der Isotopenwerte der Biomasse sowie in anderen Biomolekülen wie in vielen Aminosäuren und Phospholipid-Fettsäuren nachgewiesen wurde (Abb. 3.20 und 3.21). In einem parallel betriebenen Chemostaten wurde die doppelte Menge an  $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-4-Cl-Catechol}$  zugegeben und bereits nach 15 min eine  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in der 23S-rRNA der Gammaproteobakterien detektiert, welche nach 1 h signifikant gegenüber der unmarkierten Probe angestiegen war und bis 3 h nach Substratzugabe konstant blieb (Abb. 3.22). Die Analyse der rRNA 24 h nach Substratzugabe zeigte sowohl in der 23S-rRNA der Gammaproteobakterien (MT1 und Spuren von MT4) als auch in der 23S-rRNA der Betaproteobakterien (MT3) eine signifikante Isotopenanreicherung gegenüber der unmarkierten Probe. Die rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 erreichte im gemessenen Zeitraum zwar nicht die Isotopenwerte wie die rRNA aus *Pseudomonas* sp. MT1, jedoch wurde mittels der Isotopenmarkierung in der rRNA die Beteiligung des Stammes MT3 in Bezug auf die Metabolisierung von 4-Cl-Catechol bzw. eines Abbauprodukts innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft im Chemostaten deutlich.

Der Nachweis des stabilen Isotops aus dem  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -markierten Substrat in den verschiedenen Biomolekülen erfolgte sowohl in den Phospholipid-Fettsäuren als auch nach Zugabe einer höheren Markierung in der 23S-rRNA. Die Isotopenanalysen zeigten, dass sowohl *Pseudomonas* sp. MT1 als auch *Achromobacter* sp. MT3 am Abbau von 4-Cl-Catechol beteiligt waren, während die Stämme *Pseudomonas* sp. MT4 und *Empedobacter* sp. MT2 aufgrund ihres geringen Vorkommens in der Kultur weder im Fettsäuremuster noch auf rRNA-Ebene nachgewiesen werden konnten. Die zeitliche Verschiebung in der Anreicherung in der rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 gegenüber *Pseudomonas* sp. MT1 von 3 - 24 h sind auf stammspezifische Unterschiede in Bezug auf die Aufnahme des Substrats, ihren Degradationsweg in der Zelle und möglicherweise auch auf die Biosynthese der rRNA-Moleküle (Kap. 4.1.3) zurückzuführen. In den vorangegangenen Batch-Experimenten wurden

aber keine Unterschiede in der Isotopenaufnahme aus dem Substrat Acetat zwischen den Stämmen MT1 und MT3 gemessen (Kap. 3.4; Abb. 3.12). Stattdessen kann von einem allgemeinen langsamen Isotopeneinbau in die RNA z.B. gegenüber den Phospholipid-Fettsäuren der beteiligten Bakterien ausgegangen werden (Kap. 4.1.4), so dass diese Biomarker-Moleküle eher für Langzeitmessungen als für kurzfristige Puls-Markierungen geeignet sind.

### **4.3 Identifizierung der 2,2'-Dichlorobiphenyl-abbauenden Bakterien in Biofilmen auf PCB**

Die Identifizierung von am Abbau beteiligter Bakterien durch Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-markiertem Substrat sollte in dieser Arbeit nicht auf die definierte mikrobielle Gemeinschaft im Chemostaten begrenzt werden, sondern auch in komplexeren Habitaten angewendet werden. In terrestrischen und aquatischen Ökosystemen bewegen sich die meisten Mikroorganismen nicht frei, sondern sind in Form an Oberflächenstrukturen anhaftender Biofilmgemeinschaften organisiert (Whitman *et al.*, 1998). Der Biofilm stellt dabei einen eigenen Lebensraum dar, der durch viele biologische, chemische und physikalische Parameter charakterisiert wird, deren Komplexität man erst langsam zu verstehen lernt. In der Vergangenheit war die Untersuchung natürlicher Biofilmgemeinschaften stets durch die Schwierigkeiten der Identifizierung von Mitgliedern *in situ* sowie der Quantifizierung physikalischer, chemischer und räumlicher Parameter limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Biofilmentwicklung direkt auf polychlorierten Biphenylen (PCB) untersucht und die mikrobiellen Gemeinschaften molekularbiologisch charakterisiert.

Auf die Verbreitung und das Gefährdungspotential von polychlorierten Biphenylen in der Umwelt wurde bereits in der Einleitung (Kap. 1.2.2) eingegangen. Die Biodegradation der für viele Organismen toxischen PCB-Kongeneren ist seit Jahren Inhalt vieler Studien, welche kürzlich von Abraham und Mitarbeitern (2002) zusammengefasst wurden. Aus vorangegangenen Experimenten mit Biofilmen aus dem gleichen PCB-kontaminierten Boden (Lünsdorf *et al.*, 2000) wurden durch die Biofilmgemeinschaft hohe Abbauleistungen auch gegenüber mehrfach chlorierten Kongeneren gemessen, zu denen keiner der im Labor isolierten und kultivierten Bakterienstämme in der Lage war (Abraham *et al.*, 2003). Daher wurde in dieser Arbeit mittels stabiler Isotope die am Abbau eines mehrfach chlorierten Kongeners innerhalb des PCB-Gemisches beteiligten Bakterien *in situ* identifiziert.

#### 4.3.1 Strukturelle Entwicklung und mikrobielle Zusammensetzung der PCB-Biofilme

Das Auftragen von „Mikrodroplets“ ( Lünsdorf *et al.*, 2001) ermöglichte die gleichmäßige Bedeckung von acetonbeständigen Trägern mit PCB-Tropfen (Abb. 3.24). Der mikrobielle Bewuchs war mikroskopisch bereits nach 3 Wochen am Rand der Tropfen sichtbar und vergrößerte sich sukzessiv. Nach 5 Wochen gab es neben Cluster-ähnlichen Biofilmstrukturen nur noch wenige PCB-bedeckte Bereiche (Abb. 3.26) und nach 4 Monaten wurde eine vollständige Bedeckung der PCB-Strukturen beobachtet (Abb. 3.25). Bei der Zusammensetzung der Biofilmgemeinschaft handelte es sich um sehr unterschiedliche Bakterienstämme, was unter anderem durch die Morphologien der Zellen mittels DAPI-DNA-Färbung sichtbar wurde. Der Aufbau der Zellcluster ähnlicher PCB-Biofilme wurde zuvor von Lünsdorf und Mitarbeitern (2000) elektronenmikroskopisch analysiert und die Anlagerung von Tonmineralien aus dem Boden in den Biofilmen nachgewiesen, welche möglicherweise einen Schutz vor hohen Konzentrationen von PCB-Kongeneren bilden oder den Abbau der hydrophoben PCBs fördern.

Bei schadstoffabbauenden Biofilmgemeinschaften kann die enge räumliche Anordnung aus mehreren Gründen von Bedeutung sein. So können hierdurch z.B. Akkumulationen von toxischen Zwischenprodukten verhindert (Knackmuss, 1984), Nischen für bestimmte Prozesse wie die reduktive Dehalogenierung (Dolfing *et al.*, 1995) gebildet oder Bakterien in direkte Nachbarschaft gebracht werden, deren Abbauwege verknüpft sind (Nielsen *et al.*, 2000). Möglicherweise ist die Ausbildung von Zellaggregaten für das direkte Nebeneinander von Organismen, die bei der Metabolisierung der PCBs aufeinander angewiesen sind, notwendig.

Die Ausbildung der mikrobiellen Biofilme korrespondierte mit dem Abbau des PCB-Gemisches (Abb. 3.27). Nach 5-wöchigem Wachstum konnte zwar kein vollständiger Abbau einzelner Kongenere gemessen werden, da sich noch Reste unbesiedelter PCB-Tropfen auf dem Träger befanden (Abb. 3.26), aber die durch biologische Prozesse verursachte Abnahme vor allem der zwei- und dreifach chlorierten Kongenere war signifikant. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits im Kongeneren-Muster des PCB-kontaminierten Bodens aus Wittenberg und vorangegangener PCB-Biofilme gemacht, wo gegenüber der Mischung Aroclor 1242 die niedrigchlorierten PCBs fehlten und zusätzlich auch höher chlorierte Kongenere abgebaut werden konnten (Nogales *et al.*, 1999). Zu diesen Degradationsleistungen war keiner der aus dem Boden bzw. von weiteren Biofilmen isolierten Bakterienstämme befähigt (Abraham *et al.*, 2003), so dass zur Identifizierung der PCB-Abbauer *in situ* eine kultivierungsunabhängige Methode nötig war.

Aus den auf PCB gewachsenen Biofilmen wurde rRNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert, um Fingerprintanalysen der aktiven Mikroorganismen mittels „Single stranded confirmation polymorphism“ (SSCP, Schwieger und Tebbe, 1998) durchzuführen. Ein Vorteil dieser molekularbiologischen Methode liegt darin, dass auch bis heute unkultivierte Bakterien erfasst werden, zu denen im Biofilm annähernd die Hälfte der analysierten Sequenzen gehörten (Tab. 3.10). Auffallend für dieses hydrophobe und für viele Organismen toxische Substrat PCB war die hohe Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft.

Ein Großteil der sequenzierten Banden wurde den Alpha- und Beta-Proteobakterien zugeordnet, was in Übereinstimmung mit den von Nogales und Mitarbeitern (2001) generierten Klonbanken aus der rRNA des PCB-kontaminierten Bodens aus Wittenberg lag. Stämme der Gattung *Methylobacterium* und *Burkholderia* waren erwartet worden, da sie bereits zuvor aus dem als Inokulum verwendeten Boden isoliert wurden (Abraham *et al.*, 2003). *Burkholderia*-ähnliche Stämme wurden zudem als Abbauer von chlorierten Benzoaten in Waldboden-Mikrokosmen identifiziert (Ramirez-Saad *et al.*, 2000). Des weiteren wurden im PCB-Biofilm Stämme der Gruppen *Planctomycetes* und *Bacteroidetes* detektiert, welche sich in den zuvor generierten Klonbanken des PCB-kontaminierten Bodens wiederfanden (Nogales *et al.*, 2001). Die Gruppe der *Planctomycetes* wurde bereits in einer Vielzahl von Habitaten in Süß- und Salzwasser, Belebtschlamm und im Boden nachgewiesen, obgleich bis heute nur wenige Stämme kultiviert wurden (Neef *et al.*, 1998). Die meisten *Planctomycetes* sind aerob und organotroph (Fuerst, 1995), wobei auch autolithotrophe Bakterien mit der Fähigkeit zur anaeroben Oxidation von Ammonium aus Abwasser isoliert werden konnten, welche in hohen Zellkonzentrationen ( $10^{10}$  bis  $10^{11}$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) in Biofilmen organisiert waren (Strous *et al.*, 1999) und auch zur Struktur der Biofilme auf den PCB-beschichteten Trägern beitrugen. Erste Hinweise auf die physiologischen und ökologischen Eigenschaften der Bakterien im Biofilm können die Habitate der über 16S-rRNA-Sequenzen identifizierten nächsten Verwandten geben, welche z.B. aus Biofilmen in Klimaanlage oder Trinkwasserbiofilmen isoliert wurden oder aus ebenfalls mit Schadstoffen kontaminiertem Sandboden.

Die von Nogales und Mitarbeitern aufgestellten Klonbibliotheken aus dem PCB-kontaminierten Boden beschrieben 362 unterschiedliche Sequenzen innerhalb von 404 analysierten Sequenzen. Nach der durchgeführten „Rarefaction“-Analyse, welche die Anzahl der erwarteten und tatsächlich detektierten phylogenetischen Gruppen vergleicht, war die Anzahl der Sequenzen noch nicht erreicht, welche eine genaue Beschreibung der bakteriellen Diversität im Boden erlaubt (Nogales *et al.*, 2001). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sich noch weitere Bakterienstämme im analysierten PCB-kontaminierten Boden befanden, welche sich in dem in dieser Arbeit analysierten Biofilm wiederfanden.

Möglicherweise war aber auch das in dieser Arbeit gezeigte molekulare Abbild des PCB-Biofilms nicht vollständig, welches in der gewählten Methode begründet sein kann. Sie beginnt mit dem mechanischen Aufschluss der Zellen, auf den die unterschiedlichen Strukturen der bakteriellen Zellwand von Gram-positiven und -negativen Bakterien und die Einbettung in den Biofilm Einflüsse nehmen können. Eine Inhibition der anschließenden enzymatischen Umsetzungen der extrahierten rRNA-Moleküle (reverse Transkription und PCR) könnte durch Spuren des hydrophoben aromatischen Substrats PCB erfolgt sein. Kritisch angemerkt werden muss an dieser Stelle, dass bei allen PCR-basierenden Methoden in komplexen Umweltproben, also auch bei den SSCP-Analysen, geringes Vorkommen von bestimmten Bakterien, die Anzahl von rRNA-Genen und Ribosomen und die Auswahl der Primer, welche bevorzugte Bindung an die rRNA bestimmter Bakteriengruppen zur Folge haben kann, das amplifizierte Bild verfälschen können.

Die SSCP-Analyse wurde ursprünglich zur Detektion von Mutationen entwickelt (Orita *et al.*, 1989; Hayashi, 1991) und wurde von Schwieger und Tebbe (1998) zur Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften angepasst. Neben der Auswahl von Primern, welche an möglichst konservierte Bereiche des rRNA-Gens binden müssen, um einen Großteil aller in der Umweltprobe vorkommenden Bakterien zu erfassen (Schmalenberger *et al.*, 2001), ist vor allem die Interpretation des Silber-gefärbten Bandenmusters von Bedeutung. Hier kann ein Bakterienstamm z.B. durch Operonheterogenität mehrere Banden ergeben (Schmalenberger *et al.*, 2001) oder bei der Analyse komplexer Gemeinschaften wie der Rhizosphäre von Mais kann unter einer Bande eine Vielzahl verschiedener Sequenzen (bis 24 phylogenetisch unterschiedliche Gruppen) verborgen sein, welche erst durch Klonierung unterscheidbar und identifizierbar sind (Schmalenberger und Tebbe, 2003). In dieser Arbeit sollte jedoch nicht die Identifizierung aller abundanten und aktiven Bakterien in den PCB-Biofilmen im Vordergrund stehen, sondern vor allem die aktive Aufnahme der polychlorierten Biphenyle durch die verschiedenen Organismengruppen anhand von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat bestätigt werden.

#### **4.3.2 Isotopenmarkierung des PCB-Biofilms mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-2,2'-Dichlorobiphenyl**

Wie im definierten Konsortium des Chemostaten sollten vom PCB-Biofilm nach der Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat die rRNA-Moleküle verschiedener phylogenetischer Gruppen auf ihren Isotopeneinbau analysiert werden. Für diese Messungen war jedoch die extrahierte Menge an Gesamt-RNA zu gering. Zunächst angenommene methodische Probleme durch die immer noch hohen Konzentrationen der PCBs während der RNA-Extraktion wurden ausgeschlossen (Kap. 3.6.2). Die geringe Anzahl von Zellen und unzureichender Aufschluss der Zellen könnten weitere Ursachen sein. Jedoch wurden mittels DAPI-Färbung  $5 \times 10^8$  bis  $2 \times 10^9$  Zellen pro Extraktion ermittelt, aus welchen als Kulturen von aus dem Boden

isolierten Bakterien ausreichend rRNA extrahiert werden konnte. Zusätzlich deuteten die vorher aus dem gleichen Boden generierten Klonbibliotheken (Nogales *et al.*, 2001), die in dieser Arbeit durchgeführten SSCP- und Lipid-Analyse (Kap. 3.6.3 und 3.6.5) sowie Transmissions-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen ähnlicher auf PCB aufgewachsenen Biofilme (Lünsdorf, persönliche Mitteilungen) auf hauptsächlich Gram-negative Proteobakterien hin, die mittels der gewählten RNA-Extraktion (Kap. 2.6.1.3) leicht aufzuschließen sind.

Wahrscheinlich sind die geringen RNA-Mengen nach der Extraktion durch die Struktur der Biofilme oder einen zu geringen Ribosomengehalt der Bakterien im PCB-Biofilm zu erklären. In natürlichen Ökosystemen sind Mikroorganismen in der Regel Nährstoffmangel ausgesetzt. In diesen nährstoffarmen Umgebungen herrschen langsam wachsende Bakterien mit einer geringen metabolischen Aktivität vor. Die hiermit verbundenen niedrigen Ribosomenzahlen pro Zelle sorgen unter anderem für ein schwaches Signal bei der *in situ* Hybridisierung (Poulsen *et al.*, 1993). Durch die Zugabe von leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen wie Glucose und Hefeextrakt sowie einer geringen Konzentration von Chloramphenicol vor der Hybridisierung kann die Signalstärke bei der *in situ* Hybridisierung deutlich erhöht werden, da die Behandlung eine Vergrößerung des Zellvolumens und eine Erhöhung des Ribosomengehaltes unter gleichzeitiger Unterdrückung der Zellteilung verursacht (Ouverney und Fuhrmann, 1997). In einer vorangegangenen Arbeit, in der der gleiche PCB-belastete Boden mittels FISH analysiert wurde (Niepel, 1999), konnten coryneforme Bakterien erst nach Zugabe von 5 mg L<sup>-1</sup> Hefeextrakt detektiert werden. Diese Art der Stimulation sollte in der vorliegenden Arbeit aber nicht angewendet werden, da es möglicherweise die Biofilmgemeinschaft verändert hätte und die Isotopenwerte der rRNA der Bakterien von Interesse waren, welche nicht Hefeextrakt, sondern PCB als Nahrungsquelle nutzen können.

Die Markierung mit dem [U-<sup>13</sup>C]-markierten PCB-Kongener 2,2'-Dichlorobiphenyl sollte wichtige Hinweise auf die am Abbau beteiligten Bakterien ergeben. Da die möglichen Biomarker-Moleküle der rRNA für eine Hybridisierung nicht in ausreichender Menge extrahiert werden konnten, wurden die Phospholipid-Fettsäuren als Biomarker-Moleküle genutzt.

Fettsäureprofile biologischer Gemeinschaften wurden bereits in einer Vielzahl unterschiedlicher Ökosysteme erstellt, um die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit, nach gezielten Eingriffen und Umweltveränderungen oder an verschiedenen Orten zu vergleichen (Rajendran und Nagatomo, 1999; Hedrick *et al.*, 2001). Die gesättigten Fettsäuren C16:0 und C18:0 werden in unterschiedlichen Abundanzen von allen Bakterien synthetisiert und dienen als Vorläuferfettsäuren in der Biosynthese aller weiteren Fettsäuren. Die einfach ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide (PLFA) wie C16:1 $\omega$ 7, C18:1 $\omega$ 7 und

C18:1 $\omega$ 9 sind dagegen charakteristisch für Gram-negative Eubakterien, während endständig verzweigte Fettsäuren C15:0i, C15:0a, C16:0i, C17:0i und C17:0a vorzugsweise von Gram-positiven oder anaeroben Mikroorganismen synthetisiert werden (White *et al.*, 1996). Aus dem auf PCB aufgewachsenen Biofilm wurden neben gesättigten Fettsäuren hauptsächlich einfach ungesättigte Fettsäuren extrahiert, was auf eine große Zahl Gram-negativer Eubakterien schließen lässt. Die Abwesenheit der verzweigten Fettsäuren spricht gegen das Vorkommen Gram-positiver oder anaerober Organismen im Biofilm. Ebenso konnten keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren detektiert werden, welche von eukaryotischen Zellen synthetisiert werden (White *et al.*, 1996), was mit den mikroskopischen Untersuchungen des Biofilms übereinstimmt (Kap. 3.6.1).

Seit Jahren ist bekannt, dass die Fettsäurezusammensetzung durch zahlreiche exogene Faktoren wie die Wachstumstemperatur, Medienzusammensetzung oder das physiologische Alter der Zellen beeinflusst werden kann. Marr und Ingram stellten 1962 bei bakteriellem Wachstum unter Mangelbedingungen zum einen eine Erhöhung des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren und zum anderen von cis- zu trans- einfach- ungesättigten Fettsäuren fest. Ebenso wurde bei Gram-negativen Bakterien in der stationären Wachstumsphase die Umwandlung von einfachungesättigten Fettsäuren in Cyclopropyl- fettsäuren beobachtet (Guckert *et al.*, 1985; Kieft *et al.*, 1994). Da im analysierten Biofilm hauptsächlich einfachungesättigte Fettsäuren und wenig gesättigte bzw. keine zyklischen Fettsäuren detektiert wurden, werden keine dieser beschriebenen Mangel- oder Stressbedingungen angezeigt. Häufig haben exogene Einflüsse wie unterschiedliche Substrate lediglich quantitative und keine qualitativen Auswirkungen auf die synthetisierten Fettsäuren (Abraham *et al.*, 1998; Niepel, 1999).

Die deutlichsten Hinweise auf die Organismen, welche nach der Isotopenmarkierung die angereicherten Fettsäuren synthetisierten, konnten bakterielle Isolate aus dem verwendeten Boden geben (Abraham *et al.*, 2003). Bakterien der Gattung *Methylobacterium* waren bereits durch die SSCP-Analyse identifiziert worden (Tab. 3.10) und synthetisierten als Reinkulturen zusammen mit der neu zu beschreibenden Gattung „*Wittenbergia*“ (phylogenetisch nahe *Beijerinckia*) zu einem hohen Prozentsatz die Fettsäure C18:1 $\omega$ 7 sowie C16:0, welche im Biofilm einen großen Anteil der Gesamt-Fettsäuren ausmachte (Abb. 3.30). Die insgesamt 17 unterschiedlichen Isolate, die der Gattung *Burkholderia* zugeordnet wurden (Kap. 2.3.2, Tab. 2.2), besaßen ein deutlich anderes Fettsäureprofil als die übrigen Isolate, wobei neben C16:0 die Fettsäuren C17:1 $\omega$ 6, C18:1 $\omega$ 9, C19:0d7,8 und C20:1 $\omega$ 9 synthetisiert wurden, welche weder in den isolierten Bakterien der Gattungen *Methylobacterium* noch in den Gattungen „*Wittenbergia*“ und *Arthrobacter* vorkamen. Die für *Arthrobacter* unter Laborbedingungen charakteristische Fettsäure C15:0a konnte im Biofilm nicht detektiert werden, was auf eine geringe Abundanz dieser Bakterien im Biofilm hinweisen kann. Auf der anderen Seite waren

noch weitere nicht kultivierte Bakteriengattungen im Biofilm vorhanden, da die Fettsäure C16:1 $\omega$ 7, die mit 13 % einen relativ hohen Anteil an den Phospholipid-Fettsäuren des Biofilms bildete, in den Isolaten nur in Spuren (0 – 1 %) wiedergefunden wurde.

Nach dem Aufwuchs der Biofilme über den Zeitraum von fünf Wochen auf PCB-Kongeneren, denen [U- $^{13}\text{C}$ ]-2,2'-Dichlorobiphenyl in geringer Konzentration zugemischt war (Kap. 3.7), wurde ein sehr divergentes Markierungsmuster in den Fettsäuren sichtbar. Parallel zu den  $^{13}\text{C}$ -markierten Biofilmen wurde in diesem Experiment kein unmarkierter Biofilm analysiert. Erfahrungsgemäß kann aber bei allen Fettsäuren von Isotopenwerten zwischen  $\delta^{13}\text{C} = -35$  und  $-10$  ‰ ausgegangen werden, da die Isotopenwerte der als Substrat zur Verfügung stehenden PCB-Kongeneren durchschnittlich  $\delta^{13}\text{C} = -25$  ‰ betrugen. Zudem wurde in der Mehrzahl der Glykolipid-Fettsäuren selbst nach 5 Wochen Wachstum auf dem  $^{13}\text{C}$ -markierten PCB Isotopenwerte zwischen  $\delta^{13}\text{C} = -33$  und  $-10$  ‰ gemessen, was als unmarkierte Grundlage im Vergleich zu den markierten Phospholipid-Fettsäuren dienen kann.

Die Phospholipid-Fettsäuren C17:1 $\omega$ 6 und C18:1 $\omega$ 9 des Biofilms waren am stärksten mit dem stabilen Isotop angereichert, was auf Gram-negative Eubakterien als Konsumenten hinweist. Die ebenso einfach ungesättigten Fettsäuren C18:1 $\omega$ 7 und C16:1 $\omega$ 7 wiesen dagegen nur relativ geringe Markierungen auf, obgleich sie mit C16:0 die abundantesten Phospholipid-Fettsäuren des Biofilms waren. Überträgt man diese Anreicherungsmuster auf die in den isolierten Bakterien-Gattungen charakteristischen Fettsäuren, so wurde in die Fettsäuren der Gattungen *Methylobacterium* und „*Wittenbergia*“ wenig Kohlenstoff aus dem Substrat 2,2'-Dichlorobiphenyl inkorporiert. Die Fettsäure C16:1 $\omega$ 7, welche keiner isolierten Bakterien-Gattung zugeordnet werden konnte, war ebenso gering mit dem stabilen Isotop angereichert, während die im Biofilm stark  $^{13}\text{C}$ -markierten Fettsäuren nur in den isolierten Bakterien der Gattung *Burkholderia* vorkamen.

Die in dieser Arbeit gemessenen Abundanz- und Isotopenwerte der Fettsäuren des PCB-Biofilms weisen darauf hin, dass, obgleich die Bakterien der Gattung *Burkholderia* mengenmäßig im Biofilm nicht dominierten, sie dennoch für den primären Abbau des markierten Dichlorobiphenyls verantwortlich waren, was vorangegangene Vermutungen bestätigt (Nogales *et al.*, 2001; Abraham *et al.*, 2002 und 2003). Die rRNA als Biomarker-Molekül hätte je nach Sonden-Auswahl möglicherweise eine bessere phylogenetische Auflösung als die Fettsäuren geboten. Trotzdem war durch den sehr breiten methodischen Ansatz, welcher zuvor mittels kultivierungsabhängiger und -unabhängiger Charakterisierungen des PCB-belasteten Bodens und der Biofilme durchgeführt wurde (Nogales *et al.*, 1999 und 2001; Lünsdorf *et al.*, 2000 und 2001; Osborn *et al.*, 2000 und Abraham *et al.*, 2002 und 2003), durch die Isotopenanalyse der Phospholipid-Fettsäuren das entscheidende Indiz zur Identifizierung von Stämmen der Gattung *Burkholderia* als Abbauer von PCB gegeben.



Die zuvor isolierten und kultivierten Stämme der Gattung *Burkholderia* konnten in Laborversuchen neben Biphenyl und einigen Chlorbenzoaten kein chloriertes Biphenyl als einzige Kohlenstoffquelle nutzen (Abraham *et al.*, 2003). Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Bakterien, welche im Biofilm zum Abbau der mehrfach chlorierten Biphenyle in der Lage waren, im Labor nicht kultiviert werden konnten, oder dass den Stämmen weitere im PCB-Gemisch vorhandene Substrate oder andere Bakterienstämme gefehlt haben. In vielen mikrobiellen Gemeinschaften wurden bereits höhere Leistungen in Bezug auf die Degradation xenobiotischer organischer Verbindungen beobachtet als das Potential ihrer Einzelorganismen (Pelz *et al.*, 1999; Top und Springael, 2003). Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass auch innerhalb der PCB-Biofilme die Bakteriengemeinschaften intraspezifische metabolische Netzwerke ausgebildet haben, welche für die Abbauleistung des gesamten Biofilms verantwortlich sind.

#### **4.4 Identifizierung der am Abbau definierter Substrate beteiligten Bakterien in Belebtschlamm**

Im dritten in dieser Arbeit analysierten Habitat sollte überprüft werden, ob die Isotopenmarkierung nach dem definierten mikrobiellen Konsortium im Chemostaten und dem durch das hydrophobe und xenobiotische Substrat sehr selektiven PCB-Biofilm auch in einer hoch komplexen biologischen Gemeinschaft angewendet werden kann. Dafür wurde Belebtschlamm aus einer kommunalen Kläranlage analysiert, welchem definierte  $^{13}\text{C}$ -markierte Substrate zugegeben wurden, um die am Abbau beteiligten Bakteriengruppen zu identifizieren.

Kommunales Abwasser, per Definition der DIN 4 045 „nach häuslichem, gewerblichem oder industriellem Gebrauch verändertes, insbesondere verunreinigtes Wasser“, enthält eine Vielzahl fester, flüssiger und gasförmiger organischer und anorganischer Inhaltsstoffe. Art und Höhe der Belastung ist in starkem Maße abhängig vom Herkunftsbereich des Wassers. Im Durchschnitt liegt die Belastung des Abwassers mit Inhaltsstoffen bei  $1 \text{ g L}^{-1}$ , mit einem Anteil von etwa 50 % organischer Verbindungen (Neitzel und Iske, 1998). Das Abwasser durchläuft eine Kläranlage, um durch mechanische, physikalische, chemische und vor allem mikrobielle Umsetzungen so weit gereinigt zu werden, dass es in die Umwelt zurückgeführt werden kann. Die Mikroorganismen des Belebtschlamm spielen die entscheidende Rolle zur Entfernung von organischen Verbindungen aus dem Abwasser (Madigan *et al.*, 1997), indem sie diese Verbindungen zu  $\text{CO}_2$  und in neue Biomoleküle umsetzen. Der Kohlenstoff ist anschließend in den Belebtschlamm-Flocken gebunden und kann im Absetzbecken vom Wasser abgetrennt werden. Halogenorganische Verbindungen stellen aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften, ihrer in der Regel geringen mikrobiologischen Abbaubarkeit und großen

Neigung zur Bioakkumulation ein hohes Gefährdungspotential dar (Neitzel und Iske, 1998). Da die Eintragspfade in die Umwelt komplex und schwer reglementierbar sind, müssen die Verbindungen in der Kläranlage aus dem Abwasser entfernt werden, um die vom Gesetzgeber aufgestellten Grenzwerte für bestimmte Stoffgruppen bzw. Summenkenngrößen in Klärschlamm und Kläranlagenablauf einzuhalten. In dieser Arbeit wurde speziell das Abbaupotential von mikrobiellen Gruppen innerhalb des Belebtschlamms in Bezug auf die aromatischen Verbindungen 4-Cl-Catechol und Phenol sowie Histidin und Acetat untersucht.

Die Zusammensetzung von Belebtschlamm wird routinemäßig in jeder Kläranlage mikroskopisch oder über Kultivierungen im Labor kontrolliert, um Störungen frühzeitig zu erkennen. Genauer wurden die prozentualen Anteile der mikrobiellen Gruppen im Belebtschlamm kultivierungsunabhängig mittels FISH von Snaidr und Mitarbeitern (1997) analysiert, die 81 % der mit dem DNA-Farbstoff DAPI markierten Zellen in aerobem Belebtschlamm mit der Sonde für Eubakterien (Eub 338) nachweisen konnten. Dabei wurden 41 % den Betaproteobakterien, 12 % den Gammaproteobakterien und 8 % den Alphaproteobakterien zugeordnet. Außerdem wurden 12 % als Bakterien der *Bacteroidetes*, 13 % als Gram-positive Bakterien mit hohem GC-Gehalt und 3 % als *Acinetobacter* ssp. identifiziert. Diese Anteile sind mit der mikrobiellen Zusammensetzung in weiteren Kläranlagen vergleichbar (Wagner und Loy, 2002).

Um möglichst viele Mikroorganismen des Belebtschlamms zu erfassen, wurden in der vorliegenden Arbeit wie in vorigen Habitaten die kultivierungsunabhängige Phospholipid-Fettsäureextraktion sowie molekularbiologische Methoden verwendet. Mittels RNA-Extraktion wurden die aktiven Bakterien des Belebtschlamms analysiert (Kap. 4.3.1) und im SSCP-Fingerabdruck der 16S- und 23S-rRNA die Komplexität der mikrobiellen Gemeinschaft sichtbar gemacht (Kap. 3.10.2). Die hohe Diversität der aus dem Belebtschlamm extrahierten RNA wurde auf dem SSCP-Gel durch eine Vielzahl dünner Banden, auch in der durch phylogenetische Sonden separierten rRNA, deutlich. Die Banden der Gamma- und Betaproteobakterien konnten wie erwartet als Teil der Gesamt-23S-rRNA in der Hybridisierungslösung und die Banden der Alphaproteobakterien als Teil der Gesamt-16S-rRNA detektiert werden. Die Proben der mittels Eub 338 - Sonde separierten 16S-rRNA stimmten zu etwa 80 % mit denen der Gesamt-16S-rRNA überein, was auf eine hohe Bindungseffizienz der Sonde gegenüber den im Belebtschlamm aktiven Eubakterien hinweist, welche durch die Amplifikation mit den für die SSCP gewählten Primern (Kap. 2.9.2) erfasst wurden.

Durch die Vielzahl unterschiedlicher Banden, auch in der durch phylogenetische Sonden separierten rRNA, war nach einer Isotopenmarkierung eine Verdünnung von  $^{13}\text{C}$ -angereicherter rRNA mit nicht angereicherter rRNA anderer Stämme wahrscheinlich, die mit

derselben phylogenetischen Sonde abgetrennt wurden, aber das isoto­penmarkierte Substrat nicht aufgenommen hatten. Trotzdem wurde die Gesamt-RNA des Belebtschlamm­ nach der Isotopenmarkierung in phylogenetische Gruppen aufgetrennt und neben den Fettsäuren der Phospholipide deren  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen analysiert, um mögliche Eingrenzungen auf Bakteriengruppen zu treffen. Bevor die Isotopenmarkierung mit unterschiedlichen Substraten erfolgte, mussten als Ausgangswerte die natürlichen Isotopenverteilungen in den Substraten der kontinuierlichen Kultur sowie in der Biomasse und der Gesamt-RNA ermittelt werden.

#### 4.4.1 Interpretation natürlicher Isotopenverteilungen in Belebtschlamm

Der Isotopenwert der Biomasse des Belebtschlamm­ war nach zweiwöchigem Wachstum in kontinuierlicher Kultur ohne Zugabe von markiertem Substrat mit einer Differenz von  $\Delta\delta^{13}\text{C} = -9.1\text{ ‰}$  negativer als der Wert des komplexen Mediums im Chemostaten, die Gesamt-RNA war um weitere  $\Delta\delta^{13}\text{C} = -8.1\text{ ‰}$  geringer angereichert als die Biomasse. Um die Ursache für diese starke Verringerung des  $^{13}\text{C}$ -Anteils in den Biomolekülen gegenüber dem Medium zu erklären, wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen kohlenstoffhaltigen Komponenten des Mediums errechnet und die natürlichen Isotopenverhältnisse analysiert (Tab. 3.12). Im Medium erfolgte während des zweiwöchigen Wachstums in kontinuierlicher Kultur eine Verschiebung der Isotopenverhältnisse zu positiveren Werten, was vermutlich durch die bevorzugte Aufnahme des gering  $^{13}\text{C}$ -haltigen Fleischextrakts und Casitons vom Belebtschlamm bewirkt wurde, während Glucose und das höher  $^{13}\text{C}$ -angereicherte Hydrogencarbonat länger im Medium verblieben. Der geringe Anteil von  $^{13}\text{C}$  in der Gesamt-RNA des Belebtschlamm­ kann durch isotopenspezifische Fraktionierung während der Biosynthese der Ribonukleinsäuren oder Wiederverwertung von Molekülen (siehe Kap. 4.1.3) sowie durch die Synthese aus bereits wenig mit  $^{13}\text{C}$  angereicherten Kohlenstoffverbindungen, z.B. aus den Aminosäuren Glycin und Asparaginsäure des Fleischextrakts, erklärt werden, welche in der Biosynthese der Nukleotide genutzt werden (Kap. 4.1.4).

Aufgrund des großen Spektrums verschiedener Substrate mit unterschiedlichen Isotopenwerten sowie der hohen Diversität des Belebtschlamm­ sind Voraussagen über Substratflüsse in diesem komplexen System nur schwierig zu treffen. Einblicke konnte hier nur der Einsatz von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat schaffen, dessen Kohlenstoff in Biomarker-Molekülen nachgewiesen werden sollte.

#### 4.4.2 4-Cl-Catechol-abbauende Bakterien in kontinuierlicher und in Batch-Kultur

Dem Belebtschlamm wurden vier unterschiedliche  $^{13}\text{C}$ -markierte Substrate zugegeben, um den Einbau in die rRNA der verschiedenen phylogenetischen Gruppen und in die Fettsäuren der Phospholipide zu verfolgen (Kap. 3.9). Zunächst wurde das für viele Organismen toxische 4-Cl-Catechol, welches bereits in der definierten bakteriellen Gemeinschaft des Chemostaten als markiertes Substrat eingesetzt wurde, in geringer Dosierung zum Belebtschlamm gegeben. Chlorierte aromatische Verbindungen können über Herbizide oder andere Xenobiotica ins Abwasser gelangen, werden zu Cl-Phenol und weiter zu Cl-Catechol oder mit Stickstoffkomponenten zu Cl-Anilin metabolisiert. Cl-Catechol kann aerob weiterhin zu den nicht chlorierten Produkten wie Pyruvat, Succinat und Acetyl-CoA abgebaut werden (Bitton, 1994).

In der gesamten Biomasse des Belebtschlammes in kontinuierlicher Kultur war bereits 6 h nach Zugabe von  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -4-Cl-Catechol der maximal  $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenwert von 100 ‰ erreicht. Auch in allen separierten rRNA-Proben, vor allem in der durch die Eub 338 - Sonde separierten rRNA, waren Isotopenanreicherungen sichtbar. Auch wenn die Differenzen zu den unmarkierten Proben bei allen Messungen nicht signifikant waren, so war die Anreicherung in der rRNA der Gammaproteobakterien nach drei Tagen höher als in der rRNA der Betaproteobakterien, deren Isotopenwert bereits wieder auf den Wert der unmarkierten Probe absank. Die Gammaproteobakterien, zu denen die Gattung *Pseudomonas* gehört, haben das Substrat 4-Cl-Catechol folglich stärker zur Synthese ihrer rRNA genutzt als die Betaproteobakterien, was mit den Beobachtungen in dem definierten Konsortium im Chemostaten übereinstimmt (Kap. 3.5.4). Die höhere Isotopenanreicherung in der rRNA der Eubakterien des Belebtschlammes weist auf weitere Bakterienstämme hin, welche weder zu den Beta- noch zu den Gammaproteobakterien gehören, das Substrat aber ebenso metabolisiert haben. Zur weiteren Fokussierung auf diese Bakterien wäre der Einsatz von zusätzlichen phylogenetischen Sonden, wie z.B. für Alphaproteobakterien (Alf 1b), *Bacteroidetes* (CF 319a), *Acinetobacter* (ACA 23a) und Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt (HGC 69a) (Snaidr *et al.*, 1997) erforderlich.

In den Gammaproteobakterien, welche in Belebtschlamm gegenüber den Betaproteobakterien nur ein Drittel der Bakterien ausmachen (Snaidr *et al.*, 1997), war die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung nach drei Tagen in der kontinuierlichen Kultur leicht erhöht. Durch die kontinuierliche Substratzugabe von 4-Cl-Catechol zum Vollmedium über den Zeitraum von 4 Wochen (Kap. 2.4.3) können die Verhältnisse in der bakteriellen Gemeinschaft jedoch zu Gunsten der Gammaproteobakterien verschoben worden sein (Whiteley *et al.*, 2000). Um die prozentualen Verhältnisse der Bakteriengruppen im Belebtschlamm nicht zu verändern und zudem die

Markierung zu verstärken, wurde [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol zu einer geringeren Menge an neuem Belebtschlamm in einer Batch-Kultur gegeben und die rRNA-Analyse wiederholt. Hier war in der Gesamt-RNA die <sup>13</sup>C-Anreicherung höher als in der kontinuierlichen Kultur; in der separierten rRNA aber wurden 25 h nach der Markierung keine höheren Isotopenwerte gemessen als in der kontinuierlichen Kultur. Besonders die rRNA der Eubakterien zeigte die gleiche Isotopendifferenz wie die rRNA der Proteobakterien, wobei die rRNA der Gammaproteobakterien genau wie einen Tag nach Substratzugabe zur kontinuierlichen Kultur nicht höher angereichert war als die der übrigen rRNA-Proben. Wahrscheinlich wurden während des vierwöchigen Wachstums des Belebtschlammes im Chemostaten durch die kontinuierliche Zugabe von 4-Cl-Catechol bereits Bakterien, insbesondere Gammaproteobakterien, angereichert, welche den Kohlenstoff aus dem Substrat in die Biomoleküle inkorporiert haben.

Die Analyse der prozentualen Anteile der Fettsäuren in beiden Kulturen sowie ihre Isotopenmarkierung nach [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol-Zugabe bestätigte diese Annahme (Tab. 3.14). Organismen, die unter den Kulturbedingungen im Chemostaten wachsen konnten, wurden durch eine Vorselektion angereichert, während andere ausgewaschen wurden. Die einfachungesättigten Fettsäuren C16:1 $\omega$ 7c, C18:1 $\omega$ 7 und C20:1 $\omega$ 9 sowie die zyklische Fettsäure C19:0d7,8cy, welche als Biomarker-Moleküle für Gram-negative Proteobakterien stehen (White *et al.*, 1996), nahmen prozentual während der kontinuierlichen Kultur mit 4-Cl-Catechol zu, während die gesättigten Fettsäuren C15:0, C16:0, C18:0 und C19:0 nach vierwöchigem Wachstum geringere Anteile einnahmen. Ebenso konnte die von Eukaryoten synthetisierte Fettsäure C18:2 $\omega$ 6,9 (White *et al.*, 1996), welche in Batch-Kultur einen Anteil von über 6 % an den gesamten Fettsäuren hatte, in der kontinuierlichen Kultur nicht mehr nachgewiesen werden, obgleich mikroskopisch auch nach vier Wochen Eukaryoten sichtbar waren (Kap. 3.8.1). Möglicherweise wurde C18:2 $\omega$ 6,9 in den Gesamt-Fettsäuren nicht mehr detektiert, da die Fettsäuren der bakteriellen Biomasse prozentual im Chemostaten stark zugenommen hatten. Alle Fettsäuren, deren Anteile während der kontinuierlichen Kultur anstiegen, waren auch nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol zur Batch-Kultur mit <sup>13</sup>C angereichert, besonders C18:1 $\omega$ 7 und C19:0d7,8cy. In der ubiquitären Palmitinsäure C16:0 wurden wie in C15:0 und C19:0 mittlere Anreicherungen, in der eukaryotischen Fettsäure C18:2 $\omega$ 6,9 wurde einen Tag nach der Substratzugabe keine Isotopenanreicherung gemessen. Eine ähnliche Nahrungskette von Bakterien zu Eukarya wurde nach Zugabe von <sup>13</sup>C-markiertem Toluol mittels der Isotopenanalyse von Biomarker-PL-FA aufgezeigt (Mauclaire *et al.*, 2003).

Bei einem Vergleich der Phospholipid-Fettsäuren des Belebtschlammes mit denen des im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen definierten Chemostaten-Konsortiums (Kap. 3.5) wird nur ein kleiner Anteil der im Belebtschlamm vorkommenden Fettsäuren auch von dem

definierten Konsortium synthetisiert. Die im Belebtschlamm nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol hoch angereicherte zyklische Fettsäure C19:0d7,8cy wird im Chemostaten-Konsortium hauptsächlich von *Pseudomonas* sp. MT4, aber auch von MT1 und *Achromobacter* sp. MT3 produziert und beschreibt nach Substratzugabe lediglich eine mittlere Isotopenanreicherung. Im Belebtschlamm können daher sowohl Vertreter der Gamma- als auch der Betaproteobakterien diese Fettsäure synthetisiert haben, welche das Substrat abbauen. Die im Belebtschlamm ebenso stark angereicherte Fettsäure C18:1ω7 wird von keinem der vier im Chemostaten vorkommenden Bakterienstämme synthetisiert, so dass hier kein direkter Vergleich möglich ist. Diese Fettsäure machte stattdessen einen hohen Anteil der Phospholipid-Fettsäuren des PCB-Biofilms aus und wurde hier als charakteristische Fettsäure für die Gattung *Methylobacterium* der Alphaproteobakterien eingestuft (Kap. 4.3.2). Die Beteiligung von Alphaproteobakterien im Belebtschlamm am Abbau von 4-Cl-Catechol wird ebenso durch die Isotopenanreicherung in der durch die Sonde Alf 1b separierten rRNA bestätigt (Kap. 3.9.1, Abb. 3.34).

#### 4.4.3 Phenol-, Acetat- und Histidin-abbauende Bakterien in Belebtschlamm

Zusätzlich zum Einbau von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol in die rRNA und die gesamten Fettsäuren des Belebtschlammes wurden die Isotopenwerte in den Biomarker-Molekülen nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-Phenol, -Histidin und -Acetat in Batch-Kulturen ermittelt. [U-<sup>13</sup>C]-Phenol bewirkte in allen separierten rRNA-Fractionen eine deutliche Anreicherung gegenüber den unmarkierten Proben, mit den höchsten Isotopenwerten in der rRNA der Gammaproteobakterien. Zudem war eine leichte Zunahme der Anreicherung in der rRNA der Eubakterien und Betaproteobakterien und Abnahme in der rRNA der Alphaproteobakterien über den Zeitraum von 10 h bis 50 h sichtbar. Die Isotopenwerte der durch die Eub 338-Sonde separierten rRNA waren, mit Ausnahme der rRNA der Gammaproteobakterien nach 10 h, höher als die der einzelnen rRNA-Fractionen, was neben diesen Bakterien auf weitere Stämme hinweist, welche Phenol aufgenommen haben, aber nicht zu den analysierten Proteobakterien gehörten. Ein generelles Problem bei der Übertragung von Sonden-Daten auf phylogenetische Gruppen ist, dass zwar ein Großteil, aber nicht alle Vertreter der Gruppen mit den Oligonukleotid-Sonden erfasst werden (Daims *et al.*, 1999; Whiteley *et al.*, 2000).

Bei den Fettsäuren wurde nach der Markierung mit [U-<sup>13</sup>C]-Phenol die höchste Anreicherung in der Fettsäure C16:1ω7c gemessen, welche von Gram-negativen Eubakterien synthetisiert wird. Nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol hatte diese Fettsäure kaum <sup>13</sup>C aufgenommen und die zyklische Fettsäure C19:0d7,8cy, welche durch [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol stark markiert wurde, zeigte nach Zugabe des markierten Phenols keine Anreicherung. Diese unterschiedlichen Markierungsmuster in den Fettsäuren zeigen, dass im Belebtschlamm andere Gram-negative Bakterien am Abbau von 4-Cl-Catechol beteiligt sind als von Phenol.

Von Watanabe und Mitarbeitern (1998) wurden mittels einer Kombination von kultivierungs-unabhängigen und -abhängigen Methoden verschiedene Stämme der Gattung *Pseudomonas* und *Variovorax paradoxus* als dominante Gruppen Phenol-abbauender Bakterien in Belebtschlamm identifiziert. Der genetisch veränderte Stamm *Pseudomonas* sp. SN45RE konnte die mikrobielle Gemeinschaft einer Kläranlage vor toxischen Phenol-Konzentrationen bewahren (Erb *et al.*, 1997) und in Studien von Whiteley und Mitarbeitern (2000) mit industriellem Phenol-kontaminiertem Abwasser veränderte sich die prozentuale Zusammensetzung zu 36 % Gammaproteobakterien und 19 % Betaproteobakterien in allen mit DAPI gefärbten Zellen gegenüber normalem Belebtschlamm, wobei 20 % der Bakterien mit einer Sonde für *Pseudomonaden* detektiert wurden und eine Vielzahl von Stämmen der Gattung *Pseudomonas* isoliert wurde (Whiteley *et al.*, 2001). Zudem korrelierte die Phenol-Konzentration im Belebtschlamm negativ mit der Zelldichte sowie dem Ribosomen-Gehalt der gesamten bakteriellen Gemeinschaft, jedoch positiv mit dem Ribosomen-Gehalt der Gammaproteobakterien. Keine Korrelation wurde hier bei einer Gruppe der *Pseudomonaden* (Sonde Ps, spezifisch für die Gruppe 1-*Pseudomonaden* mit Ausnahme von *P. putida*; Whiteley *et al.*, 2000) beobachtet, was neben Stämmen der Gattung *Pseudomonas* auf weitere Gammaproteobakterien als Hauptabbauer von Phenol hinweist.

Die Isotopenmarkierungen in den Fettsäuren des Belebtschlammes waren nach Zugabe von [U-<sup>13</sup>C]-Histidin und -Acetat deutlich unterschiedlich zu den Markierungen nach 4-Cl-Catechol- oder Phenol-Zugabe. In beiden Kulturen war die Fettsäure C15:0 stark mit <sup>13</sup>C angereichert, welche zusammen mit C15:0i, C15:0a und C16:0i, die ebenfalls angereichert waren, als Biomarker-Moleküle für Gram-positive Bakterien gelten (Frostegard und Baath, 1996). Nach Zugabe von markiertem Acetat hatte zudem die Fettsäure C16:1w7c, welche bereits nach Phenolzugabe am stärksten angereichert war, hohe Isotopenwerte, was für eine Metabolisierung von Acetat durch Gram-positive und Gram-negative Eubakterien spricht. Mittels *in situ* Hybridisierung und Mikroautoradiographie (MAR) mit <sup>3</sup>H- und <sup>14</sup>C-Acetat in Belebtschlamm wurden von Nielsen und Mitarbeitern (2002) unter Eisen-reduzierenden Bedingungen hauptsächlich Gamma- (20 %) und Deltaproteobakterien (5 – 10 %) mit Acetat-Aufnahme detektiert. 70 % der MAR-positiven Zellen wurden jedoch nicht weiter identifiziert und könnten, da sie mittels Eub 338 - Sonde, aber nicht mit Sonden gegen Alfa- und Beta-proteobakterien nachgewiesen wurden, zu den Gram-positiven Bakterien gehören (Nielsen *et al.*, 2002). Dies würde durch die Isotopenmarkierung in den Biomarker-Fettsäuren nach [U-<sup>13</sup>C]-Acetat-Zugabe bestätigt werden. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit im Belebtschlamm nach Acetat-Zugabe neben möglichen Mikrohabitaten aerobe Bedingungen herrschten, sind die von Nielsen und Mitarbeitern diskutierten Ergebnisse nur bedingt übertragbar.

Die Isotopenanreicherung in der rRNA der verschiedenen phylogenetischen Gruppen wurde in dieser Arbeit neben den Proben mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol und -Phenol nach Zugabe von [U- $^{13}\text{C}$ ]-Histidin gemessen (Abb. 3.35). Eine geringe Markierung war in der durch die Sonde Eub 338 separierten rRNA sichtbar. Die rRNA der Gamma- und Betaproteobakterien war gegenüber der unmarkierten Probe nicht angereichert, der  $^{13}\text{C}$ -Gehalt der rRNA der Alphaproteobakterien war sogar geringer, was auf keinen direkten Einbau des schweren Isotops aus Histidin in die rRNA der analysierten Proteobakterien hindeutet. Möglicherweise waren auch hier weitere Bakterien, wie die mittels Fettsäureanalytik detektierten Gram-positiven Eubakterien, am Abbau beteiligt oder der Kohlenstoff aus Histidin wurde nicht zur Biosynthese von Ribonukleinsäuren verwendet.

Insgesamt erwies sich die Interpretation der Isotopenanreicherungen im Belebtschlamm durch die Vielzahl an möglichen Substraten und Bakteriengruppen als schwieriger als in den zuvor analysierten Habitaten. Trotzdem konnten generelle Anreicherungsmuster sowohl in den rRNA-Proben als auch in den Fettsäuren nach Zugabe der markierten Substrate erhalten werden, deren Aussagen sich ergänzten und so Hinweise auf am Abbau beteiligte Bakterien zuließen.

#### **4.5 Vergleich der Isotopenanalysen in unterschiedlichen Biomarker-Molekülen und Biozönosen**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einbau von  $^{13}\text{C}$ -markierten Substraten in Biomarker-Moleküle der Fettsäuren und Ribonukleinsäuren mit molekularbiologischen Methoden wie der Hybridisierung mit Oligonukleotid-Sonden und SSCP-Fingerprint-Analysen zu kombinieren, um Populationen innerhalb einer Biozönose zu charakterisieren, welche aktiv in den Substratabbau involviert sind. Diese Methode wurde mit Reinkulturen in Batch-Kulturen optimiert und zunächst in einem definierten mikrobiellen Konsortium im Chemostaten angewendet. Neben der Identifizierung der Abbauer von 4-Cl-Catechol, polychloriertem Biphenyl und Phenol sollten die unterschiedlichen Biomarker-Moleküle in Bezug auf ihren Isotopeneinbau verglichen werden.

Im Chemostaten war ein Vergleich in der Isotopenanreicherung zwischen den Phospholipid-Fettsäuren und der rRNA möglich, wobei in den Fettsäuren des Konsortiums die Höhe der Anreicherung ähnlich der der Gesamt-Biomasse war und in der Gesamt-RNA während des relevanten Zeitraums geringere Isotopenwerte als in der Biomasse gemessen wurden. Trotz der hohen Isotopenwerte konnte aus den Fettsäuren nicht abgeleitet werden, ob *Pseudomonas* sp. MT1 oder *Achromobacter* sp. MT3 primär das markierte [U- $^{13}\text{C}$ ]-4-Cl-Catechol aufgenommen haben, da alle im Konsortium detektierten Fettsäuren der Phospholipide mit  $^{13}\text{C}$  angereichert waren und von beiden Stämmen synthetisiert wurden. Eine Unterscheidung



zwischen den Stämmen konnte somit nicht erfolgen. Die Trennung der Gesamt-RNA mittels Oligonukleotid-Sonden identifizierte dagegen *Pseudomonas* sp. MT1 als Hauptabbauer des markierten 4-Cl-Catechols, wobei in der rRNA von *Achromobacter* sp. MT3 24 h nach der Substratzugabe ebenso eine signifikante Anreicherung gemessen wurde, was auf eine zeitversetzte Aufnahme des markierten Kohlenstoffs, wahrscheinlich von Metaboliten des 4-Cl-Catechols, hinweist.

Ein sehr viel komplexeres mikrobielles System als das Chemostaten-Konsortium war der analysierte Biofilm auf polychlorierten Biphenylen. Im PCB-Biofilm war nach der Markierung mit [U- $^{13}\text{C}$ ]-2,2'-Dichlorobiphenyl kein Vergleich zwischen der Isotopenanreicherung der rRNA und den Fettsäuren möglich, da für die Hybridisierung und anschließende Isotopenanalyse am EA-IRMS die Menge an extrahierter Gesamt-RNA zu gering war. Trotzdem konnten mittels charakteristischer Phospholipid-Fettsäuren verschiedener aus dem PCB-kontaminierten Boden und von Biofilmen isolierter Bakterien sowie der sehr unterschiedlichen Isotopenanreicherung in den einzelnen Fettsäuren des  $^{13}\text{C}$ -markierten Biofilms Stämme der Gattung *Burkholderia* als Konsumenten identifiziert werden, welche innerhalb des metabolischen Netzwerkes des PCB-Biofilms das markierte Kongener metabolisieren und zur Synthese ihrer Biomoleküle nutzen.

Zur Analyse der Substratverwertung von 4-Cl-Catechol und Phenol sowie Histidin und Acetat in Belebtschlamm konnten beide Molekül-Klassen kombiniert werden, da hier die Menge an extrahierter Gesamt-RNA für die Messungen am EA-IRMS keine Limitierung darstellte sowie das Markierungsmuster der Biomarker-Fettsäuren unterschiedlich war. Am Beispiel des Belebtschlammes wurde die unterschiedliche phylogenetische Differenzierung der Molekül-Klassen deutlich, bei der die Biosynthese von Biomarker-Fettsäuren mit wenigen Ausnahmen auf große Gruppen, wie z.B. Eukarya oder Eubakterien bzw. Gram-negative, Gram-positive oder anaerobe Bakterien begrenzt ist. Dadurch war die Zuordnung von Gram-negativen Eubakterien für den Abbau von 4-Cl-Catechol und Phenol möglich, wobei die beiden Substrate nicht durch die gleichen Bakteriengruppen erfolgten, da unterschiedliche Fettsäuren nach der Isotopenmarkierung mit  $^{13}\text{C}$  angereichert waren. Gram-positive oder (fakultativ) anaerobe Bakterien waren stärker für die Aufnahme von Histidin und Acetat verantwortlich. Beide Substrate wurden aber auch von Gram-negativen Bakterien metabolisiert. Über den gemessenen Zeitraum von einem Tag wurde bei keinem der markierten Substrate eine Isotopenanreicherung in einer für Eukarya charakteristischen Fettsäure gemessen.

Mittels der rRNA-Analyse von Eubakterien sowie Beta-, Gamma- und Alphaproteobakterien wurden hauptsächlich die Gammaproteobakterien im Belebtschlamm für den Abbau von 4-Cl-Catechol und Phenol identifiziert, während Histidin nicht von Proteobakterien und damit möglicherweise von Gram-positiven Bakterien metabolisiert wurde, was durch die

Anreicherungen der Phospholipid-Fettsäuren bestätigt wurde. Somit konnten sich die Ergebnisse der Isotopenanalyse beider Molekül-Klassen ergänzen. Ein direkter Vergleich wäre durch den Einsatz von weiteren Sonden wie für Gram-positive Bakterien oder Eukarya möglich.

Die phylogenetischen Informationen der Ribonukleinsäuren gestatten eine sehr viel genauere Identifizierung von Bakterien als ihre synthetisierten Fettsäuren. Trotzdem gibt es Limitierungen bei der Analyse von stabilen Isotopen in der rRNA phylogenetischer Gruppen. Dies gilt besonders bei komplexen biologischen Systemen wie Belebtschlamm, bei denen als Hauptfaktoren die Probenmengen und die Diversität der Probe zu beachten sind. Die für eine EA-IRMS-Messung erforderliche Menge an rRNA von im Belebtschlamm nur zu einem geringen Prozentsatz vorkommenden Bakterien wie z.B. *Acinetobacter* (3 %; Snaidr *et al.*, 1997) kann aus der Gesamt-RNA möglicherweise nicht separiert werden (Kap. 4.1.3). Größere phylogenetische Gruppen wie Gamma-, Beta- und Alphaproteobakterien mit ausreichend rRNA sind dagegen so heterogen, dass in einer Probe neben  $^{13}\text{C}$ -angereicherten Molekülen auch viele nicht markierte rRNA-Moleküle gemessen werden, welche das Isotopenverhältnis innerhalb der Probe verringern, obgleich Hauptabbauer in der Gruppe eingeschlossen sind. Eine sukzessive Eingrenzung auf bestimmte phylogenetische Gruppen, eventuell zusammen mit Selektionsbedingungen in kontinuierlicher Kultur, ist jedoch möglich, so dass insbesondere in der Kombination mit anderen Methoden wie Fettsäureanalytik und molekularbiologischen Techniken mittels Isotopenmassenspektrometrie die aktiv an der Biodegradation von markierten Substraten beteiligten Bakterien identifiziert werden können.

Ein Nachteil der Isotopenanalyse der rRNA-Moleküle gegenüber den Phospholipid-Fettsäuren nach der Zugabe einer geringen Menge von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Substrat besteht jedoch in der langsamen Anreicherung der rRNA gegenüber anderen Biomolekülen (Kap. 4.1.4). Sie sollte daher weniger für Pulsmarkierungen als für Langzeitexperimente mit markierten Substraten oder mit natürlichen Markierungen wie z.B. zur Identifizierung methanogener Bakterien eingesetzt werden.

Je nach zu analysierendem biologischen System sollte die Isotopenmarkierung gezielt angewendet werden. Dabei ist bei der Analyse von rRNA eine sinnvolle Auswahl der Sonden zur Separation der rRNA zu beachten, welche die Phylogenie der Mikroorganismen mit dem tatsächlichen physiologischen Einbau des markierten Substrats verbindet. Am aussichtsreichsten ist in allen Fällen, insbesondere bei hochkomplexen Systemen wie Belebtschlamm oder Boden, ein polyphasischer Ansatz, bei dem verschiedene kultivierungsunabhängige Methoden wie eine molekularbiologische Charakterisierung der

---

Biozönose und die Isotopenanalyse verschiedener Biomarker-Moleküle nach einem Markierungsexperiment kombiniert werden.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden eine enorme Anzahl mikrobieller Biodegradationswege aufgeklärt. Die Herausforderung, der sich die mikrobielle Ökologie heute stellt, ist natürliche mikrobielle Gemeinschaften wie in hochkomplexen Böden oder in Biofilmen zu beleuchten. Hierbei ist die Funktion der Gemeinschaft als biologische Einheit im Wechselspiel mit der abiotischen Umwelt zu verstehen und Kenntnisse über die Rolle der einzelnen Mitglieder der Gemeinschaft zu gewinnen. Die Aufklärung von Nahrungsnetzen *in situ* liefert ein besseres Verständnis für biologische Prozesse besonders in kontaminierter Umwelt und kann in Zukunft biotechnologische Anwendungen wie biologische Sanierungsverfahren optimieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

- In der vorliegenden Arbeit wurde mittels der Isotopenmassenspektrometrie (IRMS) eine kultivierungsunabhängige Methode optimiert, durch die am Substratabbau beteiligte Bakteriengruppen identifiziert werden konnten. Mit dem stabilen Isotop  $^{13}\text{C}$  markierte Substrate, hauptsächlich chlorierte aromatische Verbindungen, wurden nach dem Einbau in Biomarker-Moleküle der ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNA) und der Phospholipidfettsäuren (PL-FA) nachgewiesen, so dass eine direkte Verbindung zwischen Struktur und Funktion innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften erreicht wurde.
- In einem definierten mikrobiellen Konsortium wurden stammspezifische Oligonukleotid-Sonden zur Differenzierung der Stämme entwickelt. Mit weiteren phylogenetischen Sonden konnten über eine Hybridisierung die rRNA-Moleküle spezifisch aus der extrahierten Gesamt-RNA der mikrobiellen Gemeinschaft abgetrennt und ihr Isotopenwert analysiert werden. Zur Separation der 23S-rRNA-Moleküle erwies sich die Kopplung der Sonde mit paramagnetischen Partikeln nach der Hybridisierung als optimal gegenüber der Hybridisierung mit direkt an die paramagnetischen Partikel gekoppelten Sonden oder der Hybridisierung auf einer planaren Bindungsfläche im Zelldurchflussverfahren.
- Zur Interpretation der Isotopenwerte einer Probe wurde am Elementaranalysator-Isotopenmassenspektrometer (EA-IRMS) die Bestimmungsgrenze von 20 mV ermittelt, welches einer eingesetzten Probemenge von 1  $\mu\text{g}$  rRNA entsprach. Ab einer für die Hybridisierung eingesetzten Menge von 0.3  $\mu\text{g}$   $^{13}\text{C}$ -markierter Gesamt-RNA war ein Nachweis, aber noch keine Quantifizierung der Markierung in der separierten 23S-rRNA möglich. Weiterhin wurde die Qualität der rRNA-Proben nach der Hybridisierung überprüft.
- Es konnte gezeigt werden, dass bei der Metabolisierung eines markierten Substrats das schwere Isotop  $^{13}\text{C}$  unterschiedlich gut in die verschiedenen Biomoleküle eingebaut wurde. So wurden in den Fettsäuren der Phospholipide direkt nach der Zugabe von markiertem Substrat hohe Isotopenanreicherungen ähnlich der Gesamt-Biomasse gemessen, während die Fettsäuren der Glykolipide keine oder lediglich geringe Anreicherungen aufwiesen. Die rRNA beschrieb nach einer Isotopenmarkierung stets eine langsamere und über den gemessenen Zeitraum geringere Anreicherung als die Gesamt-Biomasse und ist daher eher für Langzeitexperimente geeignet.

- Innerhalb des definierten mikrobiellen Chemostaten-Konsortiums, welches mit 4-Cl-Salicylat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wuchs, konnte nach Zugabe einer geringen Menge an [U-<sup>13</sup>C]-4-Cl-Catechol bereits nach 15 min eine Isotopenanreicherung in der 23S-rRNA des dominanten Stammes *Pseudomonas* sp. MT1 gemessen werden. 24 Stunden nach der Markierung folgte eine signifikante Isotopenanreicherung in der 23S-rRNA des Stammes *Achromobacter* sp. MT3. Das prozentuale Vorkommen der Stämme *Empedobacter* sp. MT2 und *Pseudomonas* sp. MT4 (1 – 2 %) in der mikrobiellen Gemeinschaft lag unterhalb der detektierbaren Grenzen für eine Isotopenmessung der Biomarker-Moleküle.
- Ein komplexes mikrobielles System bildete Biofilme, welche direkt auf polychlorierten Biphenylen (PCB) aufwuchsen und mittels SSCP-Fingerprint-Analysen molekularbiologisch charakterisiert wurden. Die Menge an extrahierten Molekülen war für eine Isotopenanalyse der rRNA zu gering. Nach der Isotopenmarkierung eines PCB-Kongeners ermöglichte aber die Isotopenmessung der PL-FA der Biofilme sowie der Vergleich mit Fettsäureprofilen isolierter Bakteriengruppen eine Identifizierung von Stämmen der Gattung *Burkholderia* als Abbauer von 2,2'-Dichlorobiphenyl.
- Der Isotopenvergleich zwischen den Biomarker-Molekülen rRNA und PL-FA lieferte wichtige Hinweise auf die am Abbau verschiedener Substrate beteiligten Bakteriengruppen in Belebtschlamm. Die Metabolisierung von 4-Cl-Catechol und Phenol erfolgte hauptsächlich durch unterschiedliche Gram-negative Gammaproteobakterien, wohingegen die Isotopenanreicherungen in beiden Biomarkern nach Zugabe von <sup>13</sup>C-markiertem Histidin und Acetat auf vorwiegend Gram-positive bzw. fakultativ anaerobe Bakterien hindeuteten.
- Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass innerhalb der definierten Grenzen die Isotopenanalyse der spezifisch separierten rRNA-Moleküle zusammen mit den Biomarker-Molekülen der PL-FA nach der Zugabe von kleinsten Mengen <sup>13</sup>C-markierter Substrate das Abbaupotential verschiedenster mikrobieller Biozönosen beschreibt. Darüber hinaus ermöglicht die Kombination von Biomarker-Molekülen und Isotopenmassenspektrometrie die Identifizierung der am organischen Abbau beteiligten Bakteriengruppen und die Aufklärung von Nahrungsbeziehungen *in situ*.

## LITERATUR

- Abelson, P. H. & Hoering, T. C. (1961).** Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. *Proc Natl Acad Sci* **47**, 623-632.
- Abraham, W.-R., Meyer, H., Lindholst, S., Vancaneyt, M. & Smit, J. (1997).** Phospho- and sulfolipids as biomarkers of *Caulobacters sensu lato*, *Brevundimonas* and *Hyphomonas*. *Syst Appl Microbiol* **20**, 522-539.
- Abraham, W.-R., Hesse, C. & Pelz, O. (1998).** Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4202-4209.
- Abraham, W.-R., Hesse, C., Pelz, O., Hermann, S., Tesar, M., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N. (2001).** Sharing of nutritional resources in bacterial communities determined by isotopic ratio mass spectrometry of biomarkers. In *Applied Microbiology*, pp. 143-154. A. Durieux & J.-P. Simon (ed.). Brüssel: Kluwer Academic Publishers.
- Abraham, W.-R. (2002).** *Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment*. Amsterdam, London, New York: Elsevier.
- Abraham, W.-R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H. & Timmis, K. N. (2002).** Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Curr Opin Microbiol* **5**, 246-253.
- Abraham, W.-R., Lünsdorf, H., Strömpl, C., Nogales, B., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N. (2003).** Microbial communities in composite biofilms participating in the degradation of PCB. *Water Air Soil Poll* **3**, 57-64.
- Abrajano, T. A. J., Murphy, D. E., Fang, J., Comet, P. & Brooks, J. M. (1994).**  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts. *Org Geochem* **21**, 611-617.
- Akkoyun, A. (2002).** Detection of low molecular weight molecules by using optical biosensors. Dissertation, TU Braunschweig.
- Albretsen, C., Kalland, K. H., Haukanes, B.-I., Havarstein, L. S. & Kleppe, K. (1990).** Applications of magnetic beads with covalently attached oligonucleotides in hybridization: isolation and detection of specific measles virus mRNA from a crude cell lysate. *Anal Biochem* **189**, 40-50.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* **25**, 3389-3402.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. (1990).** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1919-1925.

- Amann, R. I. (1995).** In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, Vol. 3.3.6, pp. 1-15. A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas & F. J. De Bruijn (ed.). Dordrecht: Kluwer.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Amann, R. & Ludwig, W. (2000).** Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microb Rev* **24**, 555-595.
- Arfmann, H.-A., Timmis, K. N. & Wittich, R.-M. (1997).** Mineralization of 4-chlorodibenzofuran by a consortium consisting of *Sphingomonas* sp. strain RW1 and *Burkholderia* sp. strain JWS. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3458-3462.
- Bach, H. J., Hartmann, A., Trevors, J. T. & Munch, J. C. (1999).** Magnetic capture-hybridization method for purification and probing of mRNA for neutral protease of *Bacillus cereus*. *J Microb Meth* **37**, 187-192.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. (1991).** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **80**, 81-84.
- Beck, H. & Mathar, W. (1985).** Polychlorierte Biphenyle. *Bundesgesundheitsblatt* **28**, 1-12.
- Behrens, S., Ruhland, C., Inacio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Fuchs, B. M. & Amann, R. (2003).** In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1748-1758.
- Bitton, G. (1994).** Wastewater Microbiology. John Wiley & Sons, Inc. Publication. New York.
- Blackwood, C. B., Marsh, T., Kim, S.-H. & Paul, E. A. (2003).** Terminal restriction fragment length polymorphisms data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **69**, 926-932.
- Blair, N., Leu, A., Munoz, E., Olsen, J., Kwong, E. & Des Marais, D. J. (1985).** Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism. *Appl Environ Microbiol* **50**, 996-1001.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jörgensen, B. B., Witte, U. & Pfannkuche, O. (2000).** A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**, 623-626.
- Boschker, H. T. S., Nold, S. C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R. J. & Capenberg, T. E. (1998).** Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by <sup>13</sup>C-labelling of biomarkers. *Nature* **392**, 801-805.

- Boschker, H. T. S., de Brouwer, J. F. C. & Cappenberg, T. E. (1999).** The contribution of macrophyte-derived organic matter to microbial biomass in salt-marsh sediments: stable carbon isotope analysis of microbial biomarkers. *Limnol Oceanogr* **44**, 309-319.
- Boschker, H. T. S. & Middelburg, J. J. (2002).** Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microb Ecol* **40**, 85-95.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brock, T. D. & Brock, M. L. (1966).** Autoradiography as a tool in microbial ecology. *Nature* **209**, 734-736.
- Buddecke, E. (1994).** *Grundriss der Biochemie*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Coffin, R., Fry, B., Peterson, B. & Whright, R. (1989).** Identification of bacterial carbon sources with stable isotope analysis. *Limnol Oceanogr* **34**, 1306-1310.
- Coffin, R. B., Devereux, R., Price, W. A. & Cifuentes, L. A. (1990).** Analysis of stable isotopes of nucleic acids to trace sources of dissolved substrates used by estuarine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2012-2020.
- Costerton, J. W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**, 137-140.
- Craig, H. (1957).** Isotopic standard for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim Cosmochim Acta* **12**, 133-149.
- Créach, V., Bertru, G. & Mariotti, A. (1997).** Natural isotopic composition of heterotrophic bacteria to determine the origin of bioavailable dissolved organic carbon. *Compt Rend Acad Sci* **320**, 339-347.
- Dahle, A. B. & Laake, M. (1982).** Diversity dynamics of marine bacteria studied by immunofluorescence staining on membrane filters. *Appl Environ Microbiol* **43**, 169-176.
- Dahllöf, I. (2002).** Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 213-217.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999).** The domain-specific probe EUB 338 is insufficient for the detection of all *bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**, 434-444.
- Davies, S. (1994).** Kinetic characterisation of DNA hybridization using real-time BIA. *Biacore Application Note*. **306**



- DeLong, E. F. (2000).** Resolving a methane mystery. *Nature* **407**, 577-579.
- Demmelmaier, H., Sauerwald, T., Koletzko, B. & Richter, T. (1997).** New insights into lipid and fatty acid metabolisms via stable isotopes. *Eur J Pediatr* **166**, 70-74.
- DeNiro, M. & Epstein, S. (1977).** Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* **197**, 261-263.
- Dennis, P., Edwards, E. A., Liss, S. N. & Fulthorpe, R. (2003).** Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* **69**, 769-778.
- Diez, C. & Simm, A. (1998).** Gene expression in rod shaped cardiac myocytes, sorted by flow cytometry. *Cardiovasc Res* **40**, 530-537.
- Dolfing, J. & Beurskens, J. E. M. (1995).** The microbial logic and environment significance of reductive dehalogenation. *Adv Microbiol Ecol* **14**, 143-206.
- Dorn, E. & Knackmuss, H.-J. (1978).** Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown *Pseudomonad* and substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechols. *Biochem J* **174**, 73-94.
- Dube, G., Henrion, A., Ohlendorf, R. & Richter, W. (1998).** Combining isotope ratio monitoring with isotope dilution techniques for high accuracy quantification in organic chemical analysis. *Rap Comm Mass Spectrom* **12**, 28-32.
- Engel, M. H., Macko, S. A. & Silfer, J. A. (1990).** Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **348**, 47-49.
- Erb, R. W., Eichner, C. A., Wagner-Döbler, I. & Timmis, K. N. (1997).** Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nature Biotechnol* **15**, 378-382.
- Fägerstam, L. G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B. & Rönnberg, I. (1992).** Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* **597**, 397-410.
- Faude, U. C. (1995).** Immunochemische Analyse mikrobieller Lebensgemeinschaften. Dissertation. Universität Leipzig.
- Faude, U. C. & Höfle, M. G. (1997).** Development and application of monoclonal antibodies for *in situ* detection of indigenous bacterial strains in aquatic ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4534-4542.
- Fedi, S., Carnevali, M., Fava, F., Andracchio, A., Zappoli, S. & Zannoni, D. (2001).** Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site. *Res Microbiol* **152**, 583-592.
- Frech, G. (1996).** Struktur und Dynamik eines 4-Chlorsalicylat-abbauenden Chemostat-Konsortiums. Diplomarbeit. TU Braunschweig.

- Fredrickson, H. L., Cappenberg, T. E. & De Leeuw, J. (1986).** Polar lipid fatty acid compositions of Lake Vechton seston - an ecological application of lipid analysis. *FEMS Microb Ecol* **38**, 381-396.
- Frostegard, A. & Baath, E. (1996).** The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol Fertil Soil* **22**, 59-95.
- Fry, B., Garritt, R., Tholke, K., Neill, C., Michener, R. H., Mersch, F. J. & Brand, W. (1996).** Cryoflow: cryofocusing nanomole amounts of CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub> from an elemental analyzer for stable isotopic analysis. *Rap Comm Mass Spectrom* **10**, 953-958.
- Fuchs, B. M., Glockner, F. O., Wulf, J. & Amann, R. (2000 a).** Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3603-3607.
- Fuchs, B. M., Zubkov, M. V., Sahm, K., Burkhill, P. H. & Amann, R. (2000 b).** Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques. *Environ Microbiol* **2**, 191-201.
- Fuchs, B. M., Syutsubo, K., Ludwig, W. & Amann, R. (2001).** In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **67**, 961-968.
- Fuerst, J. A. (1995).** The *Planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiol* **141**, 1493-1506.
- Gilbert, E. S. & Crowley, D. E. (1997).** Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1933-1938.
- Goodman, K. K. & Brenna, J. T. (1992).** High sensitivity tracer detection using high-precision gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry and highly enriched (U-<sup>13</sup>C) labeled precursors. *Anal Chem* **64**, 1088-1095.
- Guckert, J. B., Antworth, C. P., Nichols, P. D. & White, D. C. (1985).** Phospholipid, ester linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments. *FEMS Microb Ecol* **31**, 1888-1895.
- Guo, Z., Nielsen, S., Burguera, B. & Jensen, M. D. (1997).** Free fatty acid turnover measured using ultralow doses of [U-<sup>13</sup>C] palmitate. *J Lipid Res* **38**, 1888-1895.
- Gushin, D., Yershov, G., Zaslavsky, A., Gemmel, A., Shick, V., Proudnikov, D., Arenkov, P. & Mirzabekov, A. (1997).** Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA and protein microchips. *Anal Biochem* **250**, 203-211.
- Hare, P. E., Fogel, M. L., Stafford, T. W. J., Mitchell, A. D. & Hoering, T. C. (1991).** The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *J Archeol Sci* **18**, 277-292.

- Haukanes, B.-I. & Kvam, C. (1993).** Application of magnetic beads in bioassays. *Biotechnol* **11**, 60-63.
- Hayashi, K. (1991).** PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth Appl* **1**, 34-38.
- Hayes, J. M., Freeman, K. H., Popp, B. N. & Hoham, C. H. (1989).** Compound-specific isotopic analyses: a novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Adv Organ Geochem* **16**, 1115-1128.
- Hayes, J. M. (1993).** Factors controlling  $^{13}\text{C}$  contents of sedimentary organic compounds: principles and evidence. *Mar Geol* **113**, 111-126.
- Hayes, J. M. (2001).** Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. In *National Meeting of the Geological Society of America*, pp. 1-31. J. W. Valley & D. R. Cole (ed.). Boston.
- Hedrick, D. B., Peacock, A., Stephen, J. R., MacNaughton, S. J., Brüggemann, J. & White, D. C. (2001).** Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. *J Microb Meth* **41**, 235-248.
- Henze, B. (2003).** Nachweissysteme zur Genexpressionsanalytik von Bakterien. Dissertation. TU Braunschweig.
- Hermann, S. (1999).** Untersuchung des Einbaus stabiler Isotope in unterschiedliche Zellkomponenten einzelner Mitglieder bakterieller Konsortien mittels Isotopen-Massenspektrometrie (IRMS). Diplomarbeit. TU Braunschweig.
- Heuer, H. & Smalla, K. (1997).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In *Modern Soil Microbiology*, pp. 353-373. J. D. Van Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. Wellington (ed.). New York: Marcel Dekker.
- Höfle, M. G., Haas, H. & Dominik, K. (1999).** Seasonal dynamics of bacterioplankton community structure in a eutrophic lake as determined by 5S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3164-3174.
- Hrywna, Y., Tsoi, T. V., Maltseva, O. V., Ill, J. F. Q. & Tiedje, J. M. (1999).** Construction and characterization of two recombinant bacteria that grow on *ortho*- and *para*-substituted chlorobiphenyls. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2163-2169.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998).** Impact of cultur-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 227-239.
- Ivanov, V. & Sandell, E. (1992).** Characterization of polychlorinated biphenyl isomers in Sovol and trichlorobiphenyl formulations by high-resolution gas chromatography with electron capture detection and high-resolution gas chromatography-mass spectrometry techniques. *Environ Sci Technol* **26**, 2012-2017.

- Johnsson, B., Löfas, S. & Lindquist, G. (1991).** Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* **198**, 268-277.
- Kamrin, M. A. & Ringer, R. K. (1994).** PCB residues in mammals: a review. *Toxicol Environ Chem* **41**, 63-84.
- Kerkhof, L. & Ward, B. B. (1993).** Comparison of nucleic acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ratio and growth rate in a marine bacterium. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1303-1309.
- Kieft, T. L., Ringelberg, D. B. & White, D. C. (1994).** Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3292-3299.
- Kilpper-Bälz, R. (1991).** DNA-rRNA Hybridization. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt & M. Goodfellow (ed.). New York, Queensland: John Wiley & Sons Ltd.
- Kim, S. & Picardal, F. W. (2001).** Microbial growth on dichlorobiphenyls chlorinated on both rings as a sole carbon and energy source. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1953-1955.
- Knackmuss, H.-J. (1984).** Biochemistry and practical implementations of organohalide degradation. In *Current perspectives in microbial ecology*, pp. 687-693. M. J. Klug & C. A. Reddy (ed.). Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Koizumi, Y., Kelly, J. J., Nakagawa, T., Urakawa, H., El-Fantroussi, S., Al-Muzaini, S., Fukui, M., Urushigawa, Y. & Stahl, D. A. (2002).** Parallel characterization of anaerobic toluene- and ethylbenzene-degrading microbial consortia by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, RNA-DNA membrane hybridization, and DNA microarray technology. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3215-3225.
- Kuhlmeier, D. (2000).** Nachweis von Nukleinsäure-Wechselwirkungen mit Hilfe optischer Biosensoren. Dissertation. TU Braunschweig.
- Lechevalier, H. & Lechevalier, M. P. (1988).** Chemotaxonomic use of lipids - an overview. *Microb Lipids* **1**, 869-901.
- Lee, D.-H., Zu, Y.-G. & Kim, S.-J. (1996).** Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3112-3120.
- Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K.-H. & Wagner, M. (1999).** Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analysis in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1289-1297.
- Legendre, P. & Legendre, P. (1998).** *Numerical ecology*. 2<sup>nd</sup> Edition, Amsterdam, NL: Elsevier.

- Liu, W. T., Marsh, T. H., Cheng, H. & Forney, L. J. (1997).** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3112-3120.
- Lorenz, P. & Lorenz, P. (1995).** *Einführung in die biologisch-mikroskopische Belebtschlammanalyse*. Wiesbaden: Quelle & Meyer Verlag.
- Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1999).** Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* **65**, 752-757.
- Lünsdorf, H., Erb, R. W., Abraham, W.-R. & Timmis, K. N. (2000).** "Clay hutches": a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ Microbiol* **2**, 161-168.
- Lünsdorf, H., Strömpl, C., Moore, E. R. B., Bennasar, A., Osborn, A. M., Abraham, W.-R. & Timmis, K. N. (2001).** Approach to analyze interactions of microorganisms, hydrophobic substrates and soil colloids leading to formation of composite biofilms, and to study initial events in microbiogeological processes. In *Meth Enzymol*, pp. 317-331. J. N. Abelson & M. I. Simon (ed.). San Diego: Academic Press.
- Macario, A. J. L. & Convay de Macario, E. (1985).** *Monoclonal antibodies against bacteria*. Orlando: Academic Press.
- MacDonald, R. W., Barrie, L. A., Bidleman, T. F., Diamond, M. L., Gregor, D. M., Semkin, R. G., Strachan, W. M. J., Li, Y. F., Wania, F. & Alaee, M. (2000).** Contaminants in the canadian arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci Total Environ* **254**, 93-234.
- Macfadyen, L. P., Chen, D., Vo, H. C., Liao, D., Sinotte, R. & Redfield, R. J. (2001).** Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Mol Microbiol* **40**, 700-707.
- MacGregor, B. J., Brüchert, V., Fleischer, S. & Amann, R. (2002).** Isolation of small-subunit rRNA for stable isotopic characterization. *Environ Microbiol* **4**, 451-464.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (1997).** *Biology of microorganisms*. London, Sydney, Toronto: Prentice-Hall International, Inc.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Griffiths, R. I. & Bailey, M. J. (2002 a).** RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5367-5373.
- Manefield, M., Whiteley, A. S., Ostle, N., Ineson, P. & Bailey, M. J. (2002 b).** Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. *Rap Comm Mass Spectrom* **16**, 2179-2183.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K. H. (1992).** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* **15**, 593-600.

- Marr, A. G. & Ingram, J. L. (1962).** Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **84**, 1260-1267.
- Martinussen, J. & Hammer, K. (1995).** Powerful methods to establish chromosomal markers in *Lactococcus lactis*: an analysis of pyrimidine salvage pathway mutants obtained by positive selections. *Microbiol* **141**, 1883-1890.
- Mauclaire, L., Pelz, O., Thullner, M., Abraham, W.-R. & Zeyer, J. (2003).** Assimilation of toluene carbon along a bacteria-protist food chain determined by  $^{13}\text{C}$ -enrichment of biomarker fatty acids. *J Microbiol Meth* **55**, 635-649.
- Meckenstock, R. U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W. & Richnow, H. H. (1999).**  $^{13}\text{C}$  /  $^{12}\text{C}$  isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ Microbiol* **1**, 409-414.
- Meier-Augenstein, W. (1997).** The chromatographic side of isotope ratio mass spectrometry: pitfalls and answers. *LC GC Internat*, 17-25.
- Meier-Augenstein, W. (1999).** Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *J Chromatogr* **842**, 351-371.
- Melander, L. & Saunders, W. H. (1980).** *Reaction rates of isotopic molecules*. New York: John Wiley and Sons.
- Metcalf, A. C., Krsek, M., Gooday, G. W., Prosser, J. I. & Wellington, E. M. H. (2002).** Molecular analysis of a bacterial chitinolytic community in an upland pasture. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5042-5050.
- Metges, C. C., Petzke, K.-J. & Hennig, U. (1996).** Gas chromatography / combustion / isotope ratio mass spectrometric comparison of N-acetyl- and N-pivaloylamino acid esters to measure  $^{15}\text{N}$  isotopic abundances in physiological samples. *J Mass Spectrom* **41**, 1-10.
- Minnikin, D. E., Collins, D. E. & Goodfellow, M. (1979).** Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa. *J Appl Bacteriol* **47**, 87-95.
- Morasch, B., Richnow, H. H., Schink, B. & Vieth, A. (2002).** Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5191-5194.
- Morgan, J. A. W. & Winstanley, C. (1997).** Microbial biomarkers. In *Modern Soil Microbiology*, pp. 331-351. J. D. Van Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. (ed.) Wellington. New York: Marcel Dekkar.
- Mosandl, A. (1994).** GC-IRMS in der Aromastoffanalytik. *GIT Fachz Lab* **94**, 882-888.
- Muyzer, G., De Waal, E. & Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction - amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.

- Navarrete, A., Peacock, A., MacNaughton, S. J., Urmeneta, J., Mas-Castella, J., White, D. C. & Guerrero, R. (2000). Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers. *Microb Ecol* **39**, 92-99.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. & Schleifer, K. H. (1998). Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiol* **144**, 3257-3266.
- Neidhardt, F. C. & Magasanik, B. (1960). Studies on the role of ribonucleic acid in the growth of bacteria. *Biochem Biophys* **42**, 99-116.
- Neitzel, V. & Iske, U. (1998). *Abwasser: Technik und Kontrolle*. Weinheim, New York: Wiley-VCH Verlag.
- Nelson, D. & Cox, M. (2001). *Lehninger: Biochemie*. Berlin: Springer Verlag.
- Neuhard, J. & Kelln, R. A. (1996). Biosynthesis and conversions of pyrimidines. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 580-599. F. C. Neidhardt, R. Curtiss, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low & B. Magasanik (ed.). Washington D.C.: American Society for Microbiology Press.
- Nicolopoulou-Stamati, P. & Pitsos, M. A. (2001). The impact of endocrine disruptors on the female reproductive system. *Human Reprod Update* **7**, 323-330.
- Nielsen, A., Tolker-Nielsen, T., Barken, K. & Molin, S. (2000). Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* **2**, 59-68.
- Nielsen, J. L., Juretschko, S., Wagner, M. & Nielsen, P. E. (2002). Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4629-4636.
- Nielsen, J. L., Christensen, D., Kloppenborg, M. & Nielsen, P. H. (2003). Quantification of cell-specific substrate uptake by probe-defined bacteria under *in situ* conditions by microautoradiography and fluorescence *in situ* hybridization. *Environ Microbiol* **5**, 202-211.
- Niepel, T. (1999). Chemotaxonomie ausgewählter Gram-positiver Bakterien anhand ihrer polaren Lipide, Sequenzierung ihrer 16S rDNAs und Vergleich beider Methoden. Dissertation. TU-Braunschweig.
- Nogales, B., Moore, E. R. B., Abraham, W.-R. & Timmis, K. N. (1999). Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environ Microbiol* **1**, 199-212.
- Nogales, B., Moore, E. R. B., Llobet-Brosse, E., Rosello-Mora, R., Amann, R. & Timmis, K. N. (2001). Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1874-1884.

- Nomura, M., Gourse, R. & Baughman, G. (1984).** Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Ann Rev Biochem* **53**, 75-117.
- Nozaki, M., Kagamiyama, H. & Hayaishi, O. (1963).** Metapyrocatachase: purification, crystallization and some properties. *Biochem Z* **338**, 582-590.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. & Backhaus, H. (1996).** Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**, 5636-5643.
- O'Malley, V. P., Abrajano, T. A. J. & Hellou, J. (1994).** Determination of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of individual PAH from environmental samples: can PAH sources be apportioned? *Org Geochem* **21**, 809-822.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekyia, T. (1989).** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* **86**, 2766-2770.
- Orphan, V. J., House, C. H., Hinrichs, K.-U., McKeegan, K. D. & DeLong, E. F. (2001).** Methan-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**, 484-487.
- Osborn, A. M., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N. (2000).** An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* **2**, 39-50.
- Ouverney, C. C. & Fuhrmann, J. A. (1997).** Increased fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural samples treated with chloramphenicol. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2735-2740.
- Ouverney, C. C. & Fuhrmann, J. A. (1999).** Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types *in situ*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1746-1752.
- Pace, N. R. (1997).** A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Pelz, O., Cifuentes, L. A., Hammer, B. T., Kelley, C. A. & Coffin, R. B. (1998).** Tracing the assimilation of organic compounds using  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of unique amino acids in the bacterial peptidoglycan cell wall. *FEMS Microb Ecol* **25**, 229-240.
- Pelz, O. (1999).** Functional characterization of a 4-chlorosalicylate-degrading bacterial community by  $\delta^{13}\text{C}$  labeling of biomarkers. Dissertation. TU Braunschweig.
- Pelz, O., Tesar, M., Wittich, R.-M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N. & Abraham, W.-R. (1999).** Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unravelling the network of carbon sharing in a pollutant degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environ Microbiol* **1**, 167-174.



- Pelz, O., Chatzinotas, A., Zarda-Hess, A., Abraham, W.-R. & Zeyer, J. (2001).** Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using  $^{13}\text{C}$ -incorporation in fatty acids and whole -cell hybridization. *FEMS Microb Ecol* **38**, 123-131.
- Pombo, S. A., Pelz, O., Schroth, M. H. & Zeyer, J. (2002).** Field-scale  $^{13}\text{C}$ -labeling of phospholipid fatty acids (PLFA) and dissolved inorganic carbon: tracing acetate assimilation and mineralization in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *FEMS Microb Ecol* **41**, 259-267.
- Poulsen, L. K., Ballard, G. & Stahl, D. A. (1993).** Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1354-1360.
- Pouteau, E., Maugere, P., Darmaun, D., Marchini, J. S., Piloquet, H., Dumon, H., Nguyen, P. & Krempf, M. (1998).** Role of glucose and glutamine synthesis in the differential recovery of  $^{13}\text{CO}_2$  from infused  $[\text{U-}^{13}\text{C}]$  versus  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$  acetat. *Metabol* **47**, 549-554.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R. & Murrel, J. C. (2000).** Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**, 646-649.
- Rademaker, J. L. W., Louws, F. J. & De Bruijn, F. J. (1998).** Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. *Mol Microb Ecol Manual* **3.4.3**, 1-27.
- Rajendran, N. & Nagatomo, Y. (1999).** Seasonal changes in sedimentary microbial communities of two eutrophic bays estimated by biomarkers. *Hydrobiol* **393**, 117-125.
- Ramirez-Saad, H. D., Sassitsch, A., de Vos, W. M. & Akkermans, A. D. L. (2000).** Bacterial community changes and enrichment of *Burkholderia*-like bacteria induced by chlorinated benzoates in a peat-forest soil-microcosm. *Syst Appl Microbiol* **23**, 591-598.
- Rantanen, J. (1992).** Industrial and environmental emergencies. *Organohal Comp* **10**, 291-294.
- Reineke, W. (1984).** Microbial degradation of halogenated aromatic compounds. In *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 319-360. D. T. Gibson (ed.). New York: Marcel Dekker.
- Reineke, W. & Knackmuss, H.-J. (1988).** Microbial degradation of haloaromatics. *Ann Rev Microbiol* **42**, 263-287.
- Reineke, W. (2000).** Mikrobieller Abbau von Chloraromaten. *Bioforum* **1**, 21-24.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H. & Liles, M. R. (2000).** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2541-2547.

- Rosenbaum, V. & Riesner, D. (1987).** Temperature-gradient gel electrophoresis; thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem* **26**, 235-246.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. & Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350.
- Saxild, H. H., Andersen, L. N. & Hammer, K. (1996).** *Dra-nupC-pdp* operon of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence, induction by deoxyribonucleosides, and transcriptional regulation by the *deoR*-encoded DeoR repressor protein. *J Bacteriol* **178**, 424-434.
- Schleifer, K. H., Amann, R., Ludwig, W., Rothmund, C., Springer, N. & Dorn, S. (1992).** Nucleic acid probes for the identification and in situ detection of pseudomonads. In *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 127-134. E. Galli & S. Silver (ed.). Washington, D.C., USA: ASM.
- Schlömann, M. (1994).** Evolution of chlorocatechol pathways. *Biodeg* **5**, 301-321.
- Schmalenberger, A., Schwieger, F. & Tebbe, C. C. (2001).** Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3557-3563.
- Schmalenberger, A. & Tebbe, C. C. (2003).** Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Mol Ecol* **12**, 251-262.
- Schwieger, F. & Tebbe, C. C. (1998).** A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4870-4876.
- Shannon, P. O. & Weaver, W. (1969).** *The mathematical theory of communication*. Urbana, Chicago, London: The University of Illinois Press.
- Silfer, J. A., Engel, M. H., Macko, S. A. & Jumeau, E. J. (1991).** Stable carbon isotope analysis of amino acid enantiomers by conventional isotope ratio mass spectrometry and combined gas chromatography / isotope mass spectrometry. *Anal Chem* **63**, 370-374.
- Silfer, J. A., Qian, Y., Macko, S. A. & Engel, M. H. (1994).** Stable carbon isotope compositions of individual amino acid enantiomers in mollusc shell by GC/C/IRMS. *Org Geochem* **21**, 603-609.
- Skiba, A., Hecht, V. & Pieper, D. H. (2002).** Formation of protoanemonin from 2-chloro-cis,cis-muconate by the combined action of muconate cycloisomerase and muconolactone isomerase. *J Bacteriol* **184**, 5402-5409.
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1997).** Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2884-2896.

- Stahl, D. A. (1997).** Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny. In *Manual of Environmental Microbiology*, pp. 102-114. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach & M. V. Walter (ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Stahl, D. A. & Amann, R. (1991).** Development and application of nucleic acid probes. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt & M. Goodfellow (ed.). New York, Queensland: John Wiley & Sons Ltd.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. (1991).** Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *J Coll Interf Sci* **143**, 513-526.
- Stoffels, M., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1999).** rRNA probe-based cell fishing of bacteria. *Environ Microbiol* **1**, 259-271.
- Stoffels, M., Amann, R., Ludwig, W., Hekmat, D. & Schleifer, K. H. (1998).** Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* **64**, 930-939.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., Van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G. & Jetten, M. S. M. (1999).** Missing lithotroph identified as new *Planctomycete*. *Nature* **400**, 446-449.
- Stryer, L. (1995).** *Biochemistry*. New York, USA: Freeman und Company.
- Tebbe, C. C., Wenderoth, D. F., Vahjen, W., Lubke, K. & Munch, J. C. (1995).** Direct detection of recombinant gene expression by two genetically engineered yeasts in soil on the transcriptional and translational levels. *Appl Environ Microbiol* **61**, 4296-4303.
- Tesar, M., Hoch, C., Moore, E. R. B. & Timmis, K. N. (1996).** Westprinting: development of a rapid immunochemical identification for species within the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *Syst Appl Microbiol* **19**, 577-588.
- Thiele, O. W. (1979).** *Lipide, Isoprenoide mit Steroiden*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Top, E. M. & Springael, D. (2003).** The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 262-269.
- Torsvik, V. & Ovreas, L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**, 240-245.
- Torsvik, V., Ovreas, L. & Thingstad, T. F. (2002).** Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**, 1064-1066.
- Trebesius, K. H., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K. & Schleifer, K. H. (1994).** Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23S rRNA-targeted polynucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3228-3235.

- Trust, B. A., Scerno, D.H., Coffin, R. B., Mueller, J. G. & Cifuentes, L. A. (1996).** Tracing biodegradation with stable carbon isotope measurements of respired CO<sub>2</sub>. In *In situ bioremediation efficacy monitoring*. B. J. Spargo (ed.). Washington D.C.: Naval Research Laboratory.
- Tunlid, A. & White, D. C. (1992).** Biochemical analysis of biomass, community structure, nutrital status, metabolic activity of microbial communities in soil. In *Soil Biochemistry*, pp. 229-262. G. Strotzki & J. M. Bollag (ed.). New York: Marcel Dekker.
- Valinsky, L., Vedova, G. D., Scupham, A. J., Alvey, S., Figueroa, A., Yin, B., Hartin, R. J., Chrobak, M., Crowley, D. E., Jiang, T. & Borneman, J. (2002).** Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3243-3250.
- Vandamme, P., Bernadet, J.-F., Segers, P., Kersters, K. & Holmes, B. (1994).** New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 827-831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J. & Lupski, J. R. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Cell Mol Biol* **5**, 45-40.
- Wagner, M. & Loy, A. (2002).** Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 218-227.
- Ward, D. M., Weller, R. & Bateson, M. M. (1990).** 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65.
- Ward, N. L., Rainey, F. A., Hedlund, B. P., Staley, J. T., Ludwig, W. & Stackebrandt, E. (2000).** Comparative phylogenetic analyses of members of the order *Planctomycetales* and the division *Verrucomicrobia*: 23S rRNA gene sequence analysis supports the 16S rRNA gene sequence-derived phylogeny. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1965-1972.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H. & Harayama, S. (1998).** Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4396-4402.
- White, D. C., Stair, J. O. & Ringelberg, D. B. (1996).** Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* **17**, 185-196.
- White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D. & Bobbie, R. J. (1979).** Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* **40**, 51-62.
- Whiteley, A. S. & Bailey, M. J. (2000).** Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2400-2407.

- Whiteley, A. S., Wiles, S., Lilley, A. K., Philip, J. & Bailey, M. J. (2001).** Ecological and physiological analyses of *Pseudomonad* species within a phenol remediation system. *Microbiol Meth* **44**, 79-88.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. (1998).** Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 6578-6583.
- Wieser, M., Eberspächer, J., Vogler, B. & Lingens, F. (1994).** Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: structure of the *meta*-cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS Microb Letters* **116**, 73-78.
- Williams, W. A., Lobos, J. H. & Cheetham, W. E. (1997).** A phylogenetic analysis of aerobic polychlorinated biphenyl-degrading bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 207-210.
- Winkler, H. H., Daugherty, R. & Hu, F. Q. (1999).** *Rickettsia prowazekii* transports UMP and GMP, but not CMP, as building blocks for RNA synthesis. *J Bacteriol* **181**, 3238-3241.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **52**, 221-271.
- Yabuuchi, E., Kamawamura, Y., Kosako, Y. & Ezaki, T. (1998).** Emendation of the genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Rüger and Tan) comb. nov. *Microbiol Immunol* **42**, 429-438.
- Yusupov, M. M., Yusupova, G. U., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D. & Noller, H. F. (2001).** Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896.
- Zeder-Lutz, G., Altschuh, D., Geysen, H. M., Trifilieff, E., Sommermeyer, G. & Van Regenmortel, M. H. V. (1993).** Monoclonal antipeptide antibodies: affinity and kinetic rate constants measured for the peptide and the cognate protein using a biosensor technology. *Mol Immun* **30**, 145-155.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Beck, T. & Beese, F. (1992).** Signature of fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol Biochem* **24**, 317-323.
- Zuckerkindl, E. & Pauling, L. (1965).** Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**, 357-366.
- Zwirgmaier, K., Wassill, L., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (2001).** Substraction hybridization in microplates: an improved method to generate strain-specific PCR primers. *Syst Appl Microbiol* **24**, 108-115.

## ANHANG

### Sequenzanalysen der Stämme des definierten Konsortiums im Chemostaten

> *Pseudomonas* sp. MT1

Teil des Operons des ribosomalen RNA-Gens (Interspacer, 23S rDNA, Interspacer)

```
ATATAGTTGATGATGAATATTGATTTCTAGTCTTTTGATTAGATCGTTCTTTAAAAATTTGGGTATGTGATAGAA
AGATAGACTGAACGTTACTTTTCACTGGTAACGGATCAGGCTAAGGTAAAATTTGTGAGTTCTCTTAGTTGAGAAA
TTCGAATTTTCGGCGAATGTCGTCTTCACAGTATAACCAGATTGCTTGGGGTTATAT
```

```
GGTCAAGTGAAGAAGCGCATACGGTGGATGCCTTGGCAGTCAGAGGCGATGAAAGACGTGGTAGCCTGCGAAAAAG
CTTCGGGGAGTCGGCAAACAGACTTTTGATCCGGAGATGTCTGAATGGGGGAACCCAGCCATCATAAGATGGTTAT
CTTGTAAGTGAATACATAGGTGCAAGAGGCGAACCAGGGGAACCTGAAACATCTAAGTACCTGAGGAAAAAGAAATC
AACCAGAGATTCCCTTAGTAGTGGCGAGCGAACGGGGACTAGCCCTTAAGTGGCTTTGAGATTAGCGGAACGCTCT
GGAAAGTGGGCCATAGTGGGTGATAGCCCTGTACGCGAAAATCTCTTGGTCATGAAATCGAGTAGGACGGAGCA
CGAGAACTTTGTCTGAATATGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTACTGACTGACCGATAGTGAAGTAGT
ACCGTGAGGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGTAGAGGGGAGTGAAATAGATCCTGAAACCGTATGCGTACAAGCAG
TGGGAGCAGACTTTGTCTGTGACTGCGTACCTTTGTGTATAATGGGTGAGCGACTTATTTTCAGTGCGGAGCTT
AACCGAATAGGGGAGGCGTAGCGAAAGCGAGTCTTAATAGGGCGTCTAGTCGCTGGGAATAGACCCGAAACCGGG
CGATCTATCCATGGGCAGGTTGAAGGTTAGGTAACACTGACTGGAGGACCGAACCAGCTACCGTTGAAAAGTTAG
CGGATGACCTGTGGATCGGAGTGAAAGGCTAATCAAGCTCGGAGATAGCTGGTTCCTCGAAAAGCTATTTAGGT
AGCGCCTCATGTATCACTGTAGGGGGTAGAGCACTGTTTCGGCTAGGGGGTCATCCCGACTTACCAAACCGATGC
AAATCCGAATACCTACAAGTGCCGAGCATGGGAGACACACGGCGGGTGCTAACGTCCGTCGTGAAAAGGGAAAC
AACCAGACCGTCAGCTAAGGTCCCAAAGTTATGGTTAAGTGGGAAACGATGTGGGAAGGCTTAGACAGCTAGGA
GGTTGGCTTAGAAGCAGCCACCCTTTAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCTGCGCGGAAGATGT
AACGGGGCTCAAACCATAACCGAAGCTACGGGTATCACTTAGGTGATGCGGTAGAGGAGCGTTCTGTAAAGCCTG
TGAAGGTGAGTTGAGAAGCTTGCTGGAGGTATCAGAAGTGCGAATGCTGACATGAGTAACGACAATGGGTGTGAA
AAACACCCACGCCGAAAGACCAAGGTTTCTGCGCAACGTTAATCGACGCAGGGTTAGTCGGTCCCTAAGGCGAG
GCTGAAAAGCGTAGTCGATGGAAAACAGGTTAATATTCTGTACTTCTGGTTATTGCGATGGAGGGACGGAGAAG
GCTAGGCCAGCTTGCGCTTGCTTGTCCAAGTTAAGGTGGTAGGCTGAAATCTTAGGTAAATCCGGGATTCTAAG
GCCGAGAGCTGATGACGAGTGTTCTTTTAGAACACGAAGTGGTTGATGCCATGCTTCCAAGAAAAGCTTCTAAGC
TTCAGGTAACCAGGAACCGTACCCCAAACCGACACAGGTGGTTGGGTAGAGAATACCAAGGCGCTTGAGAGAACT
CGGGTGAAGGAAGTGGCAAAATGGCACCGTAACCTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGTGAGGGTGAAGGACTTGCTCC
GTAAGCCCACGCCGGTCGAAGATACCAGGCCGCTGCGACTGTTTATTAAAAACACAGCACTCTGCAACACGAAA
GTGGACGTATAGGGTGTGACGCCTGCCCGGTGCCGGAAGGTTAATTGATGGGGTTAGCTAACCGGAAGCTCTTGA
TCGAAGCCCCGGTAAACGGCGGCCGTAACCTATAACGGTCCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTGCGGTAAGTTCCGA
CCTGCACGAATGGCGTAACGATGGCGGCGCTGTCTCCACCCGAGTACTCAGTGAAATTTGAAATCGCTGTGAAGAT
GCAGTGTATCCGCGGCTAGACGGAAGGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTTGCACTGGACTTTGAATTTGCT
TGTGTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGTGACGCCAGTTCGCGTGAGCCATCCTTGAAATACCACCTGGC
AATTTTGAGGTTCTAAGTCCAGTCCGTTATCCGGATCGAGGACAGTGTATGGTGGGTAGTTTGACTGGGGCGGTC
TCCTCTTAAGAGTAACCGGAGGAGTACGAAGGTGCGCTCAGACCGGTGCGAAATCGGTGCTAGAGTATAAAGGCA
AAAGCGGCTTGACTGCGAGACAGACACGTGAGCAGGTACGAAAGTAGGTCTTAGTGATCCGTTGGTTCTGTAT
GGAAGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGAC
GGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTGCGGCTCATCACATCCTGGGGCTGAAGCCGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTTCGC
CATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAGAACGTGCTGAGACAGTTTCGGTCCCTATCTGCCGTGGACGTTTGAG
ATTTGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGACGAACCTCTGGTGTTCGGTTGTCACGCCAGTG
GCATTGCCGGGTAGCTATGTTCCGAATAGATAACCGCTGAAAGCATCTAAGCGGGAAACTAGCCTCAAGATGAGA
TCTCACTGGGACCTTGAGTCCCCTGAAGGGCCGTCGAAGACTACGACGTTGATAGGTTGGGTGTGTAAGCGCTGT
GAGGCGTTGAGCTAACCAATACTAATTGCCCGTGAGGCTTGACCATATAACACCC
```

```
AAGCAATTTGATGCTCCTAGTTGAAGAAACGAAAGAGACCAGATTGCGGTGTGTGAAGACGCAATGAACCGAAAG
TTCGTATCGTTTCAAAAACCGCAAGACTATCGCATACCCAATTTGCTGAAGCGTCGAAAGACGAGTCGGCACACC
GAATTTCTTGACGACCATAGAGCATTGGAACACCTGATCCCATCCCGAACTCAGCAGTGAAACGATGCATCGCC
GATGGTAGTGTGGGGTTTCCCATGTGAGAGTAGGTCATCG
```

> *Pseudomonas* sp. MT4

## Teil des Operons des ribosomalen RNA-Gens (Interspacer, 23S rDNA, Interspacer)

AGATCGTTCTTTAAAAATTTGGGTATGTGATAGAAAGATAGACTGAACGTTACTTTTCACTGGTAACGGATCAGGC  
TAAGGTAAAATTTGTGAGTTCTCTTAATTGAGAAATTCGAATTTTCGGCGAATGTCGTCTTCACAGTATAACCAG  
ATTGCTTGGGGTTATAT

GMTCAAGTGAAGAAGCGCATACCGGTGGATGCCTTGGCAGTCAGAGGCGATGAAAGACGTGGTAGCCTGCGAAAA  
GCTTCGGGGAGTCGGCAAACAGACTTTGATCCGGAGATMTCTGAATGGGGGAACCCAGCCATCATAAGATGGTTA  
CCTTACACTGAATACATAGGTGTAAGGGGCGAACCAGGGGAACTGAAACATCTAAGTACCCTGAGGAAAAAGAAAT  
CAACCGAGATTCCCTTAGTAGTGGCGAGCGAACGGGGACTAGCCCTTAAGTGGCTTTGAGATTAGCGGAACGTTTC  
TGGAAAGTGGGCCATAGTGGGTGATAGCCCTGTACGCGAAAAATCTCTTAGTCATGAAATCGAGTAGGACGGAGC  
ACGAGAAACTTTGTCTGAATATGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTACTGACTGACCGATAGTGAAC TAG  
TACCGTGAGGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGAGAGGGGAGTGAAATAGATCCTGAAACCGTATGCGTACAAGCCA  
GTGGGAGCCTACTTGTTAGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATTTTCAGTGCGGAGCTTA  
ACCGAATAGGGGAGGCGTAGCGAAAGCGAGTCTTAATAGGGCGTCTAGTCGCTGGGAATAGACCCGAAACCGGGC  
GATCTATCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACTAAGTGGAGGACCGAACCGACTACCGTTGAAAAGTTAGC  
GGATGACCTGTGGATCGGAGTGAAAGGCTAATCAAGCTCGGAGATAGCTGGTTCTCCTCGAAAGCTATTTAGGTA  
GCGCCTCATGTATCACTGTAGGGGGTAGAGCACTGTTTTCGGCTAGGGGGTCATCCCGACTTACCAAACCGATGCA  
AACTCCGAATACCTACAAGTGCCGAGCATGGGAGACACACGGCGGGTGCTAACGTCCGTCGTGAAAAGGGAAACA  
ACCCAGACCGTCAGCTAAGGTCCCAAAGTTATGGTTAAGTGGGAAACGATGTGGGAAGGCTTAGACAGCTAGGAG  
GTTGGCTTAGAAGCAGCCACCCTTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTAGTCGAGTCGGCCTGCGCGGAAGATGTA  
ACGGGGCTCAAACCATACACCGAAGCTACGGGTATCACGTAAGTGATGCGGTAGAGGAGCGTTCTGTAAAGCCTGT  
GAAGGTGAGTTGAGAAGCTTGCTGGAGGTATCAGAAGTGCGAATGCTGACATGAGTAACGATAATGGGTGTGAAA  
AACACCCACGCCGAAAGACCAAGGTTTCTGCGCAACGTTAATCGACGCAGGGTTAGTCGGTCCCTAAGGCGAGG  
CTGAAAAGCGTAGTCGATGGAAGAACAGGTTAATATTCTGTACTTCTGGTTATTGCGATGGAGGGACGGAGAGG  
CTAGGCCAGCTTGGCGTTGGTTGTCCAAGTTTAAAGTGGTAGGCTGGAATCTTAGGTAAATCCGGGATTTCTAAGG  
CCGAGAGCTGATGACGAGTTATCTTTTAGATGACGAACTGGTTGATGCCATGCTTCCAAGAAAAAGCTTCTAAGCT  
TCAGGTAACCAGGAACCGTACCCCAAACCGACACAGGTGGTTGGGTAGAGAATACCAAGGCGCTTGAGAGAACTC  
GGGTGAAGGAAGTAGGCAAAATGGCACCGTAACCTTCGGGAGAAGGTGCGCCGGTGAGGGTGAAGGACTTGCTCCG  
TAAGCTCATGCCGCTCGAAGATACCAGGCCGCTGCGACTGTTTATTAATAAACACAGCACTCTGCAAAACACGAAAG  
TGGACGTATAGGGTGTGACGCTGCCCGGTGCCGGAAGGTTAATTGATGGGGTAGCTAACGCGAAGCTCTTGAT  
CGAAGCCCCGGTAAACGGCGGCCGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGTAAAGTTCCGAC  
CTGCACGAATGGCGTAACGATGGCGGCGCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATTGAAATCGCTGTGAAGATGC  
AGTGTATCCGCGCTAGACGGAAGACCCCGTGAACCTTTACTATAGCTTTGCACTGGACTTTGAATTTGCTTGT  
GTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGCGTGGACGCCAGTTTCGCGTGGAGCCAACCTTGAAATACCACCTGGCAAC  
TTTGAGGTTCTAACTCAGGTCCGTTATCCGGATCGAGGACAGTGTATGGTGGGTAGTTTGAAGTGGGGCGGTCTCC  
TCCTAAAGAGTAACGGAGGAGTACGAAGGTGCGCTCAGACCGGTGCGAAATCGGTTCGTAGAGTATAAAGGCAAAA  
GCGCGCTTGACTGCGAGACAGACACGTGAGCAGGTACGAAAGTAGGTCTTAGTGATCCGGTGGTTCTGTATGGA  
AGGGCCATCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTCATATCGACGGC  
GGTGTGTTGGCACCTCGATGTGCGCTCATCACATCCTGGGGCTGAAGCCGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTCCGCAT  
TTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTTAGAACGTCGTGAGACAGTTTCGGTCCCTATCTGCCGTGGACGTTTGAGATT  
TGAGAGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGAGCAACCTCTGGTGTTCCGGTTGTCACGCCAGTGGCA  
TTGCCGGGTAGCTATGTTTCGGAATAGATAACCGCTGAAAGCATCTAAGCGGGAAACTAGCCTCAAGATGAGATCT  
CACTGGGACCTTGAGTCCCCTGAAGGGCCGTGCAAGACTACGACGTTGATAGGTTGGGTGTGTAAGCGCTGTGAG  
GCGTTGAGCTAACCAATACTAATTGCCCGTGAGGCTTGACCATATAACACC

AAGCAATTTGCGAACTCGAAAGAGACCAGATTGCGGTGTGTGAAGACGAAACGAACCGAAAGTTCGACTCTTACA  
AAACACCGAAAGCTATCACATACCCAATTTGCTGAAGCGAGGCCAGCTGGCCACGACTCAGTACCCGAATTTCTT  
GACGACCATAGAGCATTGGAACCACTGATCCCATCCCGAACTCAGCAGTGAAACGATGCATCGCCGATGGTAGT  
GTGGGGTTTCCCCATGTGAGAGTAGGTCATCGCA

> *Achromobacter* sp. MT3

## Teil des Operons des ribosomalen RNA-Gens (Interspacer, 23S rDNA, Interspacer)

GTACGGGTTGTGATTGCATTAATTTTGTTCAGTTCCTCAAGACTGGGGTGAATAACCCTAGACTGCTTTGAAAC  
TTATGAACGGCACAAACGCTAATACTCAGGTCCTATAGCCTACAGCGTTATAG

GATCAAGCGACTAAGTGCATATGGTGGATGCCTTGGCGATCACAGGCGATGAAGGACGTAGTAGCCTGCGAAAAAG  
CTACGGGGAGCTGGCAAACAAGCTTTGATCCGTAGATGTCCGAATGGGGAAACCCACCGCAGCAATGCGGTATCC  
CTGGCTGAATACATAGGCCAGTGGGAAGCGAACCAGGGTGAACCTGAAACATCTCAGTAGCTCGAGGAAAAAGAAATCA  
ACCGAGATTCCGAAAGTAGTGGCGAGCGAAATCGGAAGAGCCTTTACGTTTTAGCACGCAAGATAGTCGAACCGGA  
ATGGAAAGTCCGGCCGTAGCAGGTGATAGCCCTGTAGGCGAAATCTTGTGTGTGGAACTAAGCGTAAGACAAAGTA  
GGGCGGGACACGTGAAATCCTGTTTGAAGATGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCGTGATCGACCGGATA  
GTGAACCAGTACCGTGAGGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGAAGGGGAGTGAAATAGATCCTGAAACCGTATGCAT  
ACAAACAGTAGGAGCCTCCTTGTGGGGTGAATGCGTACCTTTTGTATAATGGGTGACGCGACTTACATTCAGTGCG  
AAGGTTAACGAATAGGGAAGCCGTAGCGAAAGCGAGTCCGAATACGGCGATTGAGTCGCTGGGTGTAGACCCGA  
AACCAGATGATCTATCCATGGCCAGGTTGAAGGCACGGTAACACGTGCTGGAGGACCGAACCCTAATGTTGAA  
AAATTAGGGGATGAGCTGTGGATAGGGGTGAAAGGCTAAACAAATCTGGAAATAGCTGGTTCTCTCCGAAAACTA  
TTTAGGTAGTGCCTCAAGTATTACTGCGGGGGGTAGAGCACTGTTATAGCTAGGGGGTTCATGCGCACTTACCAAA  
CTATGGCAAACCTCCGAATACCCGCAAGTACAGCTTGGGAGACAGAGCACCGGGGTGCTAACGTCCGGACTCAAGAG  
GGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCGAATTATCGCTAAGTGGGAAACGAAGTGGGAAGGCATAGACAGT  
CAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGATCGAGTCGTCCTGCGCGGAA  
GATGTAACGGGGCTAAGCGATAAACCGAAGCTGCGGGTGTGCACTTTTAGTGACGCGGTAGGAGAGCGTTCTGT  
AAGCCTGCGAAGGTGGCTTGTAAAGGCTGCTGGAGGTATCAGAAGTGCGAATGCTGACATGAGTAGCGATAAAGG  
GGGTGAAAAGCCCCCTCGCCGTAAGTCCAAGGTTTCTGCGCAACGTTTCATCGGCGCAGGGTGAGTCGGCCCCCTA  
AGGTCGAGGAGAGATGCGTAGCTGATGGGAAACTCGTTTAATATTCCAGTACCGTCGTACAGTGCGATGGGGGGAC  
GGATCGCGGAAGATCATCAGGGTGTGGATGTCCCTGTTGCTGTATCGAAGATGGCGCTTAGGCAAAATCCGGGCG  
CGTAAATCAAGGGTATGGCAGGAGCGAGCATTGCTTGCGAAGTGATTGGAAGTGGTTCCAAGAAAAGCCTCTAAG  
CTTCAGCTGTACGAGACCGTACCGCAAACCGACACAGGTGGACGGGATGAATATTCCAAGGCGCTTGAGAGAACT  
CAGGAGAAGGAACTCGGCAAATTGATACCGTAACTTCGGGAGAAGGTATACCCCGGTAGTGTGAAGCGCCTGCGC  
GCTTAGCATGATGGGGTTCGAGAGAATCGGTGGCTGCGACTGTTTATTAATAACACAGCACTCTGCAAAGACGAA  
AGTCGACGTATAGGGTGTGACGCTGCCCCGGTGCCGGAAGGTTAAGTGATGGGGTGCAAGCTCTTGATCGAAGCC  
CCGGTAAACGGCGGCCGTAACCTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTGCGGTAAGTTCCGACCTGCACG  
AATGGCGTAACGATGGCCACACTGTCTCCTCCTGAGACTCAGCGAAGTTGAAGTGTTTGTGATGATGCAATCTAC  
CCGCGGCTAGACGGAAGACCCCATGAACCTTTACTGTAGCTTTGCATTGATCTGTGAACCGGCCTGTGTAGGAT  
AGGTGGGAGGCTTTGAAGCGTGGTCGCTAGATCACGTGGAGCCATCCTTGAAATACCACCTGGTTTGTGTCGG  
TTCTAACCTTGGTCCGTTATCCGGATCGGGGACAGTGCATGGTGGGCAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAA  
GTGTAACGGAGGAGTTTGAAGGTACGCTAGGTACGGTCGGAATCGTGCTGATAGTGCAATGGCATAAGCGTGCT  
TGACTGTGAGACTGACAAGTCGAACAGGTGCGAAAGCAGGACATAGTGATCCGGTGGTTCTGAATGGAAGGGCCA  
TCGCTCAACGGATAAAAGGTACTCTGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCATATCGACGGCGGTGTTT  
GGCACCTCGATGTGCGCTCATCTCATCTGCGGCTGTAGCCGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTTCGCCATTTAAAGA  
GGTACGTGAGCTGGGTTTAAACGTGCTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGCCGTGGGCGTTGGATACTTGACGGA  
GCCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCGGAGTGACGTACCTCTGGTGTACCGGTTGTCATGCCAATGGCATTGCCGG  
GTAGCTAAGTACGGAAGAGATAACCGCTGAAGGCATCTAAGCGGGAAACTCGTCTGAAGATAAGGTATCCCGGGG  
ACTTGATCCCCCTGAAGGGTCGTTTCGAGACCAGGACGTTGATAGGTGCGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTTAAG  
CTAACCGATACTAATTGCCCGTGAGGCTTGATCCTATAACACTG

ATGGTTATGACCTGGTGATGTAACGTTCCAAGTGTCGTTCAATACAAAATCTGGCTGCACCGTCGGCAGCCAGCC  
AACACCAATTACACCCCCCGTGCGTGATCATCGAGTCTGACTCTGATCACCACGCGTTGTGTTTCTTCCAAGAT  
TGGAGCTGTTGCCTCGCGGCAGCCGCTCAACCAGTTACGCTTGACGACCATAGCGAGTTGGTACCCTCCTTCCC  
ATCCCGAACAGGACAGTGAAACGACTTTGCGCCGATGATAGTGACGACGACGT



> *Empedobacter* sp. MT2

## Teil des Operons des ribosomalen RNA-Gens (23S rDNA, Interspacer)

GTGCGGAGCCGTAGCGAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATGCAGTCAGTAGTATTAGACGCGAAACCTTGTGATCT  
 ACCCATGGGCAGGTTGAAGCTTTGGTAACACAAAGTGGAGGACCGAACCGGTTGACGTTGAAAAGTCTTCGGATG  
 ACCTGTGGGTAGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCTGGGAAATAGCTCGTACTCCCCGAAATGCATTTAGGTGCAGCG  
 TTTAGTTAAGTATATTAGAGGTAGAGCTACTGATTGGATGCGGGGGCTTCACCGCTACCAATTCTTGACAAACT  
 CCGAATGCTAATATATGTTTCTAGGCAGTGAGGGCATGGGTGCTAAGGTCCATGTCCGAGAGGGAAAGAACCCAG  
 ACCATCAGCTAAGGNCCCCAAATATATGCTAAGTTGAAAAAACGCGGTTGGATTGCATAGACAGCTAGGATGTTA  
 GCTTGGAAGCAGCTATTCATTTAACGAGTGCGTAACAGCTCACTAGTCGAGCGATCCGGCATGGATAATAATCGG  
 GCATAAGCATATTACCGAAGCTATGGATTACATCATTAGATGTACTGGTAGGGGAGCATTCTAACGGCGCAGAAAG  
 TCACCTGGTAATGGGTGGTGGAGCTTTTAGAAAAGAAAATGTAGGCATGAGTAACGATAAAAAAAGTGAGAAACT  
 TATTCGCCGTAAGACTAAGGTTTCCTCAGCTATGCTAATCAGCTGAGGGTTAGTCGGGACCTAACACGAACCCCTA  
 ACGGGGTAGTGGATGGCAAACGGGTAAATATTCCTGACCTGCACTCAATAAAAGTGACGAATGATTGTAGGAGG  
 TGCGTACTGACGGAATAGTACGTTGAACCTACGTAAAGTAGGGATAGTACACGAAGGCTTCGGTTGGAGTGATAA  
 TCCTCTGAAAATTGTTCCAAGAAATAGCGAGAAGTGCAGCCCGTACCGTAAACCGACACAGGTGGTCGAGGAGAG  
 TATCCTAAGGCGCTCGAGCGATTTCATGGTTAAGGAATTAGGCAAAATAGACCTGTAACCTTCGGGAGAAAGGTGCG  
 TGACAGCAATGTGAGCCTCAGTAAAAAGGCCAGGCGACTGTTTATCAAAAACACAGGACTCTGCAAAATAGAAA  
 TATGACGTATAGGGTCTGACACCTGCCCCGTGCTGGAAGGTTAAGGAAGGAGCTTAGAGGTAACTCGAAGGTTTT  
 GACTGAAGCCCCAGTAAACGGCGGCCGTAACCTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAAATTCCTTGTGCGGTAAGTTCC  
 GACCTGCACGAATGGTGTAAACGATCTGGGCACTGTCTCAACCATGATCTCGGTGAAAATTGTAGTATCGGTGAAGA  
 TGCCGGTTAATCGCAACGGGACGAAAAGACCCTGTGAACCTTTACTATAGCTTTGTATTGACTTCGGGTAAATAA  
 TGTGTAGGATAGGTGGGAGACTATGAAGCAGTATCGCTAGGTATTGTGGAGTCATTGTTGAAAATACCACCCTTTA  
 TTTACTTGGAGCCTAACTTCCTATTTGGAAGGACAGTGCATGGTGGGTAGTTTACTGCGGTGGTTCGCCTCCAAA  
 AGAGTAACGGAGGCTTTCAAAGGTACCTCAGCAGCTTGTTAACCCTGCGTAGAGTGTAATGGCATAAGGGTGC  
 TTGACTGTGAGACCTACAAGTCGATCAGGTGCGAAAGCAGGACATAGTGATCCGGTGGTTCCGTATGGAAGGGCC  
 ATCGCTCAATGGATAAAAAGTACTCCGGGGATAACAGGCTAGTCTCCCCAAGAGCTCACATCGACGGGAAGGTTT  
 GGCACCTCGATGTGCGGCTCGTCACATCCTGGGGCTGGAGAAGGTCCCAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGT  
 GGCACGCGAGCTGGGTTTCAGAACGTGCTGAGACAGTTCCGTCTCTATCTGTTGTGATCGTTAGAAGTTTGAGCGG  
 AGTTGACTCTAGTACGAGAGGACCGTGTGTAACAAACCTCTGGTGTATCAGTTGTGCCGCCAGGTGCACCGCTGA  
 GTAGCTACGTTTGGAAAGAGATAAGCACTGAAAGCATATAAGTGCGAAACTCGCCGCAAGATTAGACTTCTTTAAA  
 GGGTCGTTGTAGACTACAACGTTGATAGGCTATAGATGTAAAGGCAGTGATGTCATAGTCGAGTAGTACTAATTA  
 CCCATAGACTTTTTCTTAAAAAGTAGAACGAATCAAAG

ATAATGATAGCAATATCAAATTAATAAAGATTAAATACTAACATTGATTTAATCGTCATAGAGAAGGTTAGTTAA  
 TCTTATTTGGATTAATAAAGTAATACCAGATTGTATAGTAATAATGTCAAGATATAATAGGAACTAAAACCTATC  
 AAAAAATATTAGGGTGACTATAGCTGCAGGGCTCACCTCTTCCCATTCCGAACAGAGAAGTTAAGCCTGCCTGCC  
 CCGATGGTACTGTTACTT

**Alignment der Sequenzabschnitte**

## Teil des Operons des ribosomalen RNA-Gens (Interspacer, 23S rDNA, Interspacer)

*Pseudomonas* sp. MT1 und MT4,*Achromobacter* sp. MT3 und*Empedobacter* sp. MT2

<p>           * 20 * 40            Fsp.MT1 : ATATAGTTGATGATGAATATTGATTCTAGTCTTTGATTAGA : 43            Fsp.MT4 : TCGTTCTTTAAAAATTTGGGTATGTGATAGAAAGATAGCTGA : 3            Asp.MT3 : -----AGG : -            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 320 * 340            Fsp.MT1 : ACAGACTTTGATCGGAGATGTCGGAATGGGGGAACCCAGG : 341            Fsp.MT4 : ACAGACTTTGATCGGAGATGTCGGAATGGGGGAACCCAGG : 302            Asp.MT3 : ACAGACTTTGATCGGAGATGTCGGAATGGGGGAACCCAGG : 263            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
<p>           * 60 * 80            Fsp.MT1 : TCGTTCTTTAAAAATTTGGGTATGTGATAGAAAGATAGCTGA : 86            Fsp.MT4 : TCGTTCTTTAAAAATTTGGGTATGTGATAGAAAGATAGCTGA : 46            Asp.MT3 : -----GTAG : 6            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 360 * 380            Fsp.MT1 : ATCTATAGATGGTATTTGTACTGAATACATAGCTG-CAAGA : 383            Fsp.MT4 : ATCTATAGATGGTATTTGTACTGAATACATAGCTG-TAAG : 344            Asp.MT3 : AGG--TTGGGATCCCGG-CTGAATACATAGCCAGTGA : 303            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
<p>           * 100 * 120            Fsp.MT1 : ACGTTACCTTCACGGTAACGGATAGCTAAGGTAAATTT : 129            Fsp.MT4 : ACGTTACCTTCACGGTAACGGATAGCTAAGGTAAATTT : 89            Asp.MT3 : GTTGTGAATGCTTAATTTTTCAGTTTTCAGGCTGGG : 49            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 400 * 420            Fsp.MT1 : GCGGAACCAAGGGAACGAAACATCTAAGTACCTGAGGAAA : 426            Fsp.MT4 : GCGGAACCAAGGGAACGAAACATCTAAGTACCTGAGGAAA : 387            Asp.MT3 : ACGGAACGGAATGAACGAAACATCTAAGTACCTGAGGAAA : 346            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
<p>           * 140 * 160            Fsp.MT1 : TGAAGTCTCTTATGTTGAGAAATTCGAATTTTGGGCAATGTCG : 172            Fsp.MT4 : TGAAGTCTCTTATGTTGAGAAATTCGAATTTTGGGCAATGTCG : 132            Asp.MT3 : TGAAGTCTCTTATGTTGAGAAATTCGAATTTTGGGCAATGTCG : 92            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 440 * 460            Fsp.MT1 : GAAATCAACCGAGATTCTGTTAGTAGTGGCGAGCGAAGCGGGA : 469            Fsp.MT4 : GAAATCAACCGAGATTCTGTTAGTAGTGGCGAGCGAAGCGGGA : 430            Asp.MT3 : GAAATCAACCGAGATTCTGTTAGTAGTGGCGAGCGAAGCGGGA : 389            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
<p>           * 180 * 200            Fsp.MT1 : TCTTCACAGTTAAACAGATTGCTTGGG-ATTATATGTCACAG : 214            Fsp.MT4 : TCTTCACAGTTAAACAGATTGCTTGGG-ATTATATGTCACAG : 174            Asp.MT3 : GATTAAGTCTGGTCTTATAGCTTACAGCTTATATGTCACAG : 135            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 480 * 500            Fsp.MT1 : CTAGCCCTTAAGTGGCTTT--CTAGTACCGGAACCTCTG : 508            Fsp.MT4 : CTAGCCCTTAAGTGGCTTT--CTAGTACCGGAACCTCTG : 469            Asp.MT3 : AGAGCTTTTCTTTTATGACCTCTAGAT-CTGACGAGAA : 431            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
<p>           * 220 * 240 * 2            Fsp.MT1 : TGAAGAACGCAATC-EGTGGATGCTTGGGATCAGAGGGA : 256            Fsp.MT4 : TGAAGAACGCAATC-EGTGGATGCTTGGGATCAGAGGGA : 217            Asp.MT3 : TGAAGAACGCAATC-EGTGGATGCTTGGGATCAGAGGGA : 177            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 520 * 540 * 56            Fsp.MT1 : GAAAGTCGGGCAATAGTGGGTATAGCCCTGACGGAAGAA : 551            Fsp.MT4 : GAAAGTCGGGCAATAGTGGGTATAGCCCTGACGGAAGAA : 512            Asp.MT3 : GAAAGTCGGGCAATAGTGGGTATAGCCCTGACGGAAGAA : 473            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
<p>           * 60 * 280 * 300            Fsp.MT1 : TGAAGACGCTAGTACGCTCGGAAAAGCTTCGGGGAGCTGCGCA : 299            Fsp.MT4 : TGAAGACGCTAGTACGCTCGGAAAAGCTTCGGGGAGCTGCGCA : 260            Asp.MT3 : TGAAGACGCTAGTACGCTCGGAAAAGCTTCGGGGAGCTGCGCA : 220            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 580 * 600            Fsp.MT1 : TGTGTTGGGAGTCTAGCGTAAGCAATAGGCGGAGCAGC : 584            Fsp.MT4 : TGTGTTGGGAGTCTAGCGTAAGCAATAGGCGGAGCAGC : 545            Asp.MT3 : TGTGTTGGGAGTCTAGCGTAAGCAATAGGCGGAGCAGC : 515            Esp.MT2 : ----- : -         </p>	
1		2	
<p>           * 620 * 640            Fsp.MT1 : AGAACTTTGTCTGAAATAGGGGGACCATCTCCAGGCTAA : 627            Fsp.MT4 : AGAACTTTGTCTGAAATAGGGGGACCATCTCCAGGCTAA : 588            Asp.MT3 : AGAACTTTGTCTGAAATAGGGGGACCATCTCCAGGCTAA : 558            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 920 * 940            Fsp.MT1 : GGATCTAACCATGGGAGGTTGAAGGTTAGTAAACACGATG : 925            Fsp.MT4 : GGATCTAACCATGGGAGGTTGAAGGTTAGTAAACACGATG : 884            Asp.MT3 : GGATCTAACCATGGGAGGTTGAAGGTTAGTAAACACGATG : 853            Esp.MT2 : GGATCTAACCATGGGAGGTTGAAGGTTAGTAAACACGATG : 112         </p>	
<p>           * 660 * 680            Fsp.MT1 : ATACTAGTCTGATGACGATAGTGAATAGTACCGTGAAGGAAA : 670            Fsp.MT4 : ATACTAGTCTGATGACGATAGTGAATAGTACCGTGAAGGAAA : 631            Asp.MT3 : ATACTAGTCTGATGACGATAGTGAATAGTACCGTGAAGGAAA : 601            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 960 * 980            Fsp.MT1 : GAGGACGAAACGATGCTTTGAAAATTTAGTGATGATGCTG : 968            Fsp.MT4 : GAGGACGAAACGATGCTTTGAAAATTTAGTGATGATGCTG : 927            Asp.MT3 : GAGGACGAAACGATGCTTTGAAAATTTAGTGATGATGCTG : 896            Esp.MT2 : GAGGACGAAACGATGCTTTGAAAATTTAGTGATGATGCTG : 155         </p>	
<p>           * 700 * 720            Fsp.MT1 : GCGGAAAAGAACCCCGGTCAGGGGAGTGAATAGATCTGAA : 713            Fsp.MT4 : GCGGAAAAGAACCCCGGTCAGGGGAGTGAATAGATCTGAA : 673            Asp.MT3 : GCGGAAAAGAACCCCGGTCAGGGGAGTGAATAGATCTGAA : 642            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 1000 * 1020            Fsp.MT1 : TGGTTGGGAGTGAAAGGCAACCAAGCTGGGATAGCTGTT : 1011            Fsp.MT4 : TGGTTGGGAGTGAAAGGCAACCAAGCTGGGATAGCTGTT : 970            Asp.MT3 : TGGTTGGGAGTGAAAGGCAACCAAGCTGGGATAGCTGTT : 939            Esp.MT2 : TGGTTGGGAGTGAAAGGCAACCAAGCTGGGATAGCTGTT : 198         </p>	
<p>           * 740 * 760            Fsp.MT1 : ACCGTATGCTACAGAG-AGTGGGAGAGACTTGTCTCTGA : 755            Fsp.MT4 : ACCGTATGCTACAGAGAGTGGGAG-CTACTGTCTAGGTGA : 715            Asp.MT3 : ACCGTATGCTACAGAGAGTGGGAG-CTACTGTCTAGGTGA : 683            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 1040 * 1060            Fsp.MT1 : CTCTTCGAAA-CTATTAGGTAGCGCTCATGTATGATGTA : 1053            Fsp.MT4 : CTCTTCGAAA-CTATTAGGTAGCGCTCATGTATGATGTA : 1012            Asp.MT3 : CTCTTCGAAA-CTATTAGGTAGCGCTCATGTATGATGTA : 980            Esp.MT2 : CTCTTCGAAA-CTATTAGGTAGCGCTCATGTATGATGTA : 239         </p>	
<p>           * 780 * 800            Fsp.MT1 : CTGGTACCTTTGTGATTAATGGGTCAGGACTTATTTTCAG : 797            Fsp.MT4 : CTGGTACCTTTGTGATTAATGGGTCAGGACTTATTTTCAG : 756            Asp.MT3 : CTGGTACCTTTGTGATTAATGGGTCAGGACTTATTTTCAG : 724            Esp.MT2 : ----- : -         </p>		<p>           * 1080 * 1100 * 11            Fsp.MT1 : GGGG-CTAGAGC-AGTC-TTTCGCTAGGGGCTATCCGAC : 1092            Fsp.MT4 : GGGG-CTAGAGC-AGTC-TTTCGCTAGGGGCTATCCGAC : 1051            Asp.MT3 : GGGG-CTAGAGC-AGTC-TTTCGCTAGGGGCTATCCGAC : 1020            Esp.MT2 : TTAGGCTAGAGC-AGTC-TTTCGCTAGGGGCTATCCGAC : 280         </p>	
<p>           * 820 * 840 * 860            Fsp.MT1 : TGGGAGCTTAACCGAATAGGGAG-CTAGCGAAAGCGAGTC : 840            Fsp.MT4 : TGGGAGCTTAACCGAATAGGGAG-CTAGCGAAAGCGAGTC : 799            Asp.MT3 : TGGGAGCTTAACCGAATAGGGAG-CTAGCGAAAGCGAGTC : 767            Esp.MT2 : -----CTAGCGAAAGCGAGTC : 26         </p>		<p>           * 1140 * 1160            Fsp.MT1 : TTACCAACCGGATCAAACTCCGAATCTACAGTGGCCAGG : 1135            Fsp.MT4 : TTACCAACCGGATCAAACTCCGAATCTACAGTGGCCAGG : 1094            Asp.MT3 : TTACCAACCGGATCAAACTCCGAATCTACAGTGGCCAGG : 1063            Esp.MT2 : TTACCAACCGGATCAAACTCCGAATCTACAGTGGCCAGG : 322         </p>	
<p>           * 880 * 900            Fsp.MT1 : TTAATAAGGCGTCTAGTCTGTGGATAGACCGAAACCGGG : 882            Fsp.MT4 : TTAATAAGGCGTCTAGTCTGTGGATAGACCGAAACCGGG : 841            Asp.MT3 : TTAATAAGGCGTCTAGTCTGTGGATAGACCGAAACCGGG : 810            Esp.MT2 : TTAATAAGGCGTCTAGTCTGTGGATAGACCGAAACCGTT : 69         </p>		<p>           * 1180 * 1200            Fsp.MT1 : ATTGAGAGACACGGGGGTGCTAAGTCCCTCGGTAAGAGG : 1178            Fsp.MT4 : ATTGAGAGACACGGGGGTGCTAAGTCCCTCGGTAAGAGG : 1137            Asp.MT3 : ATTGAGAGACACGGGGGTGCTAAGTCCCTCGGTAAGAGG : 1105            Esp.MT2 : ATTGAGAGACACGGGGGTGCTAAGTCCCTCGGTAAGAGG : 364         </p>	

Fsp.MT1 : AAAGAACCCAGACCGT CAGCTAAGG CCCC AAGT TATGGTTA : 1220  
 Fsp.MT4 : AAAGAACCCAGACCGT CAGCTAAGG CCCC AAGT TATGGTTA : 1179  
 Asp.MT3 : AAAGAACCCAGACCGT CAGCTAAGG CCCC AAGT TATGGTTA : 1146  
 Esp.MT2 : AAAGAACCCAGACCGT CAGCTAAGG CCCC AAGT TATGGTTA : 406

Fsp.MT1 : ACTGCGAAA CCGATGTGGAAAGCTTAGACAGCTAGGAGTT : 1261  
 Fsp.MT4 : ACTGCGAAA CCGATGTGGAAAGCTTAGACAGCTAGGAGTT : 1220  
 Asp.MT3 : ACTGCGAAA CCGATGTGGAAAGCTTAGACAGCTAGGAGTT : 1187  
 Esp.MT2 : ACTGCGAAA CCGATGTGGAAAGCTTAGACAGCTAGGAGTT : 449

Fsp.MT1 : GCGTTTGAAGCAGCA CCGTTTAAAGAAAGGTAAGCTCA : 1303  
 Fsp.MT4 : GCGTTTGAAGCAGCA CCGTTTAAAGAAAGGTAAGCTCA : 1262  
 Asp.MT3 : GCGTTTGAAGCAGCA CCGTTTAAAGAAAGGTAAGCTCA : 1229  
 Esp.MT2 : GCGTTTGAAGCAGCA CCGTTTAAAGAAAGGTAAGCTCA : 492

Fsp.MT1 : CTAGTCGAGTCGGCTCGGGCGGAAGATGAACGGGGCTCAAGC : 1346  
 Fsp.MT4 : CTAGTCGAGTCGGCTCGGGCGGAAGATGAACGGGGCTCAAGC : 1305  
 Asp.MT3 : CTAGTCGAGTCGGCTCGGGCGGAAGATGAACGGGGCTCAAGC : 1271  
 Esp.MT2 : CTAGTCGAGTCGGCTCGGGCGGAAGATGAACGGGGCTCAAGC : 533

Fsp.MT1 : GATA CACCGAAGCTACGGGTAA CAGT TATAGTG AAGCGCG : 1384  
 Fsp.MT4 : GATA CACCGAAGCTACGGGTAA CAGT TATAGTG AAGCGCG : 1343  
 Asp.MT3 : GATA CACCGAAGCTACGGGTAA CAGT TATAGTG AAGCGCG : 1312  
 Esp.MT2 : GATA CACCGAAGCTACGGGTAA CAGT TATAGTG AAGCGCG : 573

Fsp.MT1 : TAGAGGAGCTTCTTAAAGCTCTGGAAGTGG TTAGAGAGG : 1426  
 Fsp.MT4 : TAGAGGAGCTTCTTAAAGCTCTGGAAGTGG TTAGAGAGG : 1385  
 Asp.MT3 : TAGAGGAGCTTCTTAAAGCTCTGGAAGTGG TTAGAGAGG : 1354  
 Esp.MT2 : TAGAGGAGCTTCTTAAAGCTCTGGAAGTGG TTAGAGAGG : 614

Fsp.MT1 : TTGCTGGAGTTTATAGAAATGCGAATGCTGACATGAGTAACGA : 1469  
 Fsp.MT4 : TTGCTGGAGTTTATAGAAATGCGAATGCTGACATGAGTAACGA : 1428  
 Asp.MT3 : TTGCTGGAGTTTATAGAAATGCGAATGCTGACATGAGTAACGA : 1397  
 Esp.MT2 : TTGCTGGAGTTTATAGAAATGCGAATGCTGACATGAGTAACGA : 657

5

Fsp.MT1 : AAAGCTTTAAGCTTAAAGTAAACAGAAACCGTACCGAAAC : 1812  
 Fsp.MT4 : AAAGCTTTAAGCTTAAAGTAAACAGAAACCGTACCGAAAC : 1771  
 Asp.MT3 : AAAGCTTTAAGCTTAAAGTAAACAGAAACCGTACCGAAAC : 1733  
 Esp.MT2 : AAAGCTTTAAGCTTAAAGTAAACAGAAACCGTACCGAAAC : 954

Fsp.MT1 : GACACAGGTGGTGGCGAGATATCAAGAGCGCTTGAAGAG : 1855  
 Fsp.MT4 : GACACAGGTGGTGGCGAGATATCAAGAGCGCTTGAAGAG : 1814  
 Asp.MT3 : GACACAGGTGGTGGCGAGATATCAAGAGCGCTTGAAGAG : 1776  
 Esp.MT2 : GACACAGGTGGTGGCGAGATATCAAGAGCGCTTGAAGAG : 997

Fsp.MT1 : CTCGGTGAAGGAATGGCAAAATGGCACTTCGGGA : 1898  
 Fsp.MT4 : CTCGGTGAAGGAATGGCAAAATGGCACTTCGGGA : 1857  
 Asp.MT3 : CTCGGTGAAGGAATGGCAAAATGGCACTTCGGGA : 1819  
 Esp.MT2 : CTCGGTGAAGGAATGGCAAAATGGCACTTCGGGA : 1040

Fsp.MT1 : GAAGCTGCGCGGTTAGCTGAGCACTTGGTCGTAAAGCG : 1939  
 Fsp.MT4 : GAAGCTGCGCGGTTAGCTGAGCACTTGGTCGTAAAGCG : 1898  
 Asp.MT3 : GAAGCTGCGCGGTTAGCTGAGCACTTGGTCGTAAAGCG : 1861  
 Esp.MT2 : GAAGCTGCGCGGTTAGCTGAGCACTTGGTCGTAAAGCG : 1068

Fsp.MT1 : CACCGCGTGGAAATACAGAGCGCGTGGGACTGTTATATAA : 1982  
 Fsp.MT4 : CACCGCGTGGAAATACAGAGCGCGTGGGACTGTTATATAA : 1941  
 Asp.MT3 : CACCGCGTGGAAATACAGAGCGCGTGGGACTGTTATATAA : 1904  
 Esp.MT2 : CACCGCGTGGAAATACAGAGCGCGTGGGACTGTTATATAA : 1100

Fsp.MT1 : AACACAGACTCTGCAAAAGGAAAGTGAAGCTATAGGGTGTG : 2025  
 Fsp.MT4 : AACACAGACTCTGCAAAAGGAAAGTGAAGCTATAGGGTGTG : 1984  
 Asp.MT3 : AACACAGACTCTGCAAAAGGAAAGTGAAGCTATAGGGTGTG : 1947  
 Esp.MT2 : AACACAGACTCTGCAAAAGGAAAGTGAAGCTATAGGGTGTG : 1143

Fsp.MT1 : ACCCTGCGCGGTTGGAGAGTTAAATGAGGAGTTAGG : 2066  
 Fsp.MT4 : ACCCTGCGCGGTTGGAGAGTTAAATGAGGAGTTAGG : 2025  
 Asp.MT3 : ACCCTGCGCGGTTGGAGAGTTAAATGAGGAGTTAGG : 1985  
 Esp.MT2 : ACCCTGCGCGGTTGGAGAGTTAAATGAGGAGTTAGG : 1186

7

Fsp.MT1 : GATGGGTTGA AAAACACCGACCGGAAAGCAAGGTTTC : 1511  
 Fsp.MT4 : GATGGGTTGA AAAACACCGACCGGAAAGCAAGGTTTC : 1470  
 Asp.MT3 : GATGGGTTGA AAAACACCGACCGGAAAGCAAGGTTTC : 1439  
 Esp.MT2 : GATGGGTTGA AAAACACCGACCGGAAAGCAAGGTTTC : 699

Fsp.MT1 : CTCGGCAAGCTTATCGACCGAGGGTACTCGCTCTAAAGC : 1554  
 Fsp.MT4 : CTCGGCAAGCTTATCGACCGAGGGTACTCGCTCTAAAGC : 1513  
 Asp.MT3 : CTCGGCAAGCTTATCGACCGAGGGTACTCGCTCTAAAGC : 1482  
 Esp.MT2 : CTCGGCAAGCTTATCGACCGAGGGTACTCGCTCTAAAGC : 742

Fsp.MT1 : GAGGCTAAAGAGGTAGCGGATGGAAACGGTTAATATTCCT : 1597  
 Fsp.MT4 : GAGGCTAAAGAGGTAGCGGATGGAAACGGTTAATATTCCT : 1556  
 Asp.MT3 : GAGGCTAAAGAGGTAGCGGATGGAAACGGTTAATATTCCT : 1525  
 Esp.MT2 : GAGGCTAAAGAGGTAGCGGATGGAAACGGTTAATATTCCT : 785

Fsp.MT1 : GTACTCTGCTTATTCGATGGAGACGAGAGCTTAGGCG : 1640  
 Fsp.MT4 : GTACTCTGCTTATTCGATGGAGACGAGAGCTTAGGCG : 1599  
 Asp.MT3 : GTACTCTGCTTATTCGATGGAGAGCTTAGGCG : 1568  
 Esp.MT2 : GTACTCTGCTTATTCGATGGAGAGCTTAGGCG : 819

Fsp.MT1 : AGTTTGGCTGGTGTCTCAAGCTTAAAGTGGAGCTGAAT : 1683  
 Fsp.MT4 : AGTTTGGCTGGTGTCTCAAGCTTAAAGTGGAGCTGAAT : 1642  
 Asp.MT3 : AGTTTGGCTGGTGTCTCAAGCTTAAAGTGGAGCTGAAT : 1610  
 Esp.MT2 : AGTTTGGCTGGTGTCTCAAGCTTAAAGTGGAGCTGAAT : 852

Fsp.MT1 : CTAAAGAAATCGGGATGTAGGCGAGAGCTGACAGAG : 1726  
 Fsp.MT4 : CTAAAGAAATCGGGATGTAGGCGAGAGCTGACAGAG : 1685  
 Asp.MT3 : CTAAAGAAATCGGGATGTAGGCGAGAGCTGACAGAG : 1649  
 Esp.MT2 : CTAAAGAAATCGGGATGTAGGCGAGAGCTGACAGAG : 888

6

Fsp.MT1 : GTTCTTTAGAACACGAGGTGGTGAATCCCTGTTCCCAAGA : 1769  
 Fsp.MT4 : GTTCTTTAGAACACGAGGTGGTGAATCCCTGTTCCCAAGA : 1728  
 Asp.MT3 : GTTCTTTAGAACACGAGGTGGTGAATCCCTGTTCCCAAGA : 1691  
 Esp.MT2 : GTTCTTTAGAACACGAGGTGGTGAATCCCTGTTCCCAAGA : 922

Fsp.MT1 : AAGCGGAAGTTTGTAGGAAGCCCGTTAAACGCGCGCGCTA : 2109  
 Fsp.MT4 : AAGCGGAAGTTTGTAGGAAGCCCGTTAAACGCGCGCGCTA : 2068  
 Asp.MT3 : AAGCGGAAGTTTGTAGGAAGCCCGTTAAACGCGCGCGCTA : 2022  
 Esp.MT2 : AAGCGGAAGTTTGTAGGAAGCCCGTTAAACGCGCGCGCTA : 1229

Fsp.MT1 : ACTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATCCTTGTGGGTAAAT : 2152  
 Fsp.MT4 : ACTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATCCTTGTGGGTAAAT : 2111  
 Asp.MT3 : ACTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATCCTTGTGGGTAAAT : 2065  
 Esp.MT2 : ACTATAACGGTCTTAAGGTAGCGAAATCCTTGTGGGTAAAT : 1272

Fsp.MT1 : TCGACCTGACAGAAATGGTAAAGAGTGGGCTGTCTCTCA : 2195  
 Fsp.MT4 : TCGACCTGACAGAAATGGTAAAGAGTGGGCTGTCTCTCA : 2154  
 Asp.MT3 : TCGACCTGACAGAAATGGTAAAGAGTGGGCTGTCTCTCA : 2108  
 Esp.MT2 : TCGACCTGACAGAAATGGTAAAGAGTGGGCTGTCTCTCA : 1315

Fsp.MT1 : CCGAGCTCTCGAGAAATTTGATATGCTGTGAGATGCAAGG : 2238  
 Fsp.MT4 : CCGAGCTCTCGAGAAATTTGATATGCTGTGAGATGCAAGG : 2196  
 Asp.MT3 : CCGAGCTCTCGAGAAATTTGATATGCTGTGAGATGCAAGG : 2150  
 Esp.MT2 : CCGAGCTCTCGAGAAATTTGATATGCTGTGAGATGCAAGG : 1357

Fsp.MT1 : TACCGCGCTAGACGAAAGACCGGTGAACCTTTACTATA : 2281  
 Fsp.MT4 : TACCGCGCTAGACGAAAGACCGGTGAACCTTTACTATA : 2238  
 Asp.MT3 : TACCGCGCTAGACGAAAGACCGGTGAACCTTTACTATA : 2192  
 Esp.MT2 : TACCGCGCTAGACGAAAGACCGGTGAACCTTTACTATA : 1399

Fsp.MT1 : GCTTTGACTGGAATTTGAATTTGCTGTGTAGGATAGGTGGG : 2324  
 Fsp.MT4 : GCTTTGACTGGAATTTGAATTTGCTGTGTAGGATAGGTGGG : 2281  
 Asp.MT3 : GCTTTGACTGGAATTTGAATTTGCTGTGTAGGATAGGTGGG : 2235  
 Esp.MT2 : GCTTTGACTGGAATTTGAATTTGCTGTGTAGGATAGGTGGG : 1442

Fsp.MT1 : AGCTTTGAAGCTGGACGAGGTGGTGGAGTCAAGCTTG : 2367  
 Fsp.MT4 : AGCTTTGAAGCTGGACGAGGTGGTGGAGTCAAGCTTG : 2324  
 Asp.MT3 : AGCTTTGAAGCTGGACGAGGTGGTGGAGTCAAGCTTG : 2278  
 Esp.MT2 : AGCTTTGAAGCTGGACGAGGTGGTGGAGTCAAGCTTG : 1485

8

```

      *      2420      *      2440      *
Fsp.MT1 : AAATACCAACCTCTGGCAACCTTGAAGTTCTAACTCAGGTCGGTT : 2410
Fsp.MT4 : AAATACCAACCTCTGGCAACCTTGAAGTTCTAACTCAGGTCGGTT : 2367
Asp.MT3 : AAATACCAACCTCTGGCAACCTTGAAGTTCTAACTCAGGTCGGTT : 2321
Esp.MT2 : AAATACCAACCTCTGGCAACCTTGAAGTTCTAACTCAGGTCGGTT : 1522

```

```

      *      2460      *      2480      *
Fsp.MT1 : ATCCGGAACCGGACACTCTATGGTGGGAGTTTGACTGGGGG : 2453
Fsp.MT4 : ATCCGGAACCGGACACTCTATGGTGGGAGTTTGACTGGGGG : 2410
Asp.MT3 : ATCCGGAACCGGACACTCTATGGTGGGAGTTTGACTGGGGG : 2364
Esp.MT2 : ATTTGGA---GGACACTCTATGGTGGGAGTTTGACTGGGGG : 1562

```

```

      *      2500      *      2520      *      2
Fsp.MT1 : GGTCTCCTCCAAAGGTAACGGAGGAGTACAAAGGTGGCT : 2496
Fsp.MT4 : GGTCTCCTCCAAAGGTAACGGAGGAGTACAAAGGTGGCT : 2453
Asp.MT3 : GGTCTCCTCCAAAGGTAACGGAGGAGTACAAAGGTGGCT : 2407
Esp.MT2 : GGTCTCCTCCAAAGGTAACGGAGGAGTACAAAGGTGGCT : 1605

```

```

      *      2540      *      2560      *      2580
Fsp.MT1 : AGACCGGTGGGAACCGCTCTAGAGTAAAGGCAAAAGGCG : 2539
Fsp.MT4 : AGACCGGTGGGAACCGCTCTAGAGTAAAGGCAAAAGGCG : 2496
Asp.MT3 : GGTACCGGTGGGAACCGCTCTAGAGTAAAGGCAAAAGGCG : 2450
Esp.MT2 : AGACCGGTGGGAACCGCTCTAGAGTAAAGGCAAAAGGCG : 1648

```

```

      *      2600      *      2620
Fsp.MT1 : SCTTGACTGGGAGAGTACAGTCTGAGTACGAAAGTACG : 2582
Fsp.MT4 : SCTTGACTGGGAGAGTACAGTCTGAGTACGAAAGTACG : 2539
Asp.MT3 : SCTTGACTGGGAGAGTACAGTCTGAGTACGAAAGTACG : 2493
Esp.MT2 : SCTTGACTGGGAGAGTACAGTCTGAGTACGAAAGTACG : 1691

```

```

      *      2640      *      2660
Fsp.MT1 : GTATAGTGATCCGGTGGTTCTGATGGAAGGGCCATCGCTCA : 2625
Fsp.MT4 : GTATAGTGATCCGGTGGTTCTGATGGAAGGGCCATCGCTCA : 2582
Asp.MT3 : GTATAGTGATCCGGTGGTTCTGATGGAAGGGCCATCGCTCA : 2536
Esp.MT2 : GTATAGTGATCCGGTGGTTCTGATGGAAGGGCCATCGCTCA : 1734

```

```

      *      2680      *      2700
Fsp.MT1 : GGGATAAAGGTACTCGGGGATAACAGGCTGATACGCCCAA : 2668
Fsp.MT4 : GGGATAAAGGTACTCGGGGATAACAGGCTGATACGCCCAA : 2625
Asp.MT3 : GGGATAAAGGTACTCGGGGATAACAGGCTGATACGCCCAA : 2579
Esp.MT2 : GGGATAAAGGTACTCGGGGATAACAGGCTGATACGCCCAA : 1777

```

9

```

      *      3020      *      3040      *
Fsp.MT1 : CTTCAAGATAGAGTCTCACT---GGGAGTTGAGTCCCTAA : 3009
Fsp.MT4 : CTTCAAGATAGAGTCTCACT---GGGAGTTGAGTCCCTAA : 2966
Asp.MT3 : CTTCAAGATAGAGTCTCACT---GGGAGTTGAGTCCCTAA : 2919
Esp.MT2 : CTTCAAGATAGAGTCTCTTAAAGGTTGAGTCTCACT--- : 2117

```

```

      *      3060      *      3080      *
Fsp.MT1 : GGGCGCTGGGAAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3051
Fsp.MT4 : GGGCGCTGGGAAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3008
Asp.MT3 : GGGCGCTGGGAAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 2961
Esp.MT2 : A--AGGCTGATAGGCTA--TAGATTAAGGCTGTGATGT : 2153

```

```

      *      3100      *      3120      *      314
Fsp.MT1 : CTTTGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3093
Fsp.MT4 : CTTTGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3050
Asp.MT3 : CTTTGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3003
Esp.MT2 : ATATGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 2196

```

```

      *      3160      *      3180
Fsp.MT1 : GCTTGAAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3136
Fsp.MT4 : GCTTGAAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3080
Asp.MT3 : GCTTGAAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3046
Esp.MT2 : AGTGAAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 2233

```

```

      *      3200      *      3220
Fsp.MT1 : AGATTCGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3178
Fsp.MT4 : AGATTCGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3122
Asp.MT3 : GTTCCGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3089
Esp.MT2 : TTTTGAAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 2276

```

```

      *      3240      *      3260
Fsp.MT1 : AAGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3221
Fsp.MT4 : AAGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3164
Asp.MT3 : AAGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3132
Esp.MT2 : AAGGAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 2316

```

```

      *      3280      *      3300      *
Fsp.MT1 : TACCGATATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3250
Fsp.MT4 : TACCGATATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3199
Asp.MT3 : TACCGATATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 3175
Esp.MT2 : GTTGTATAGTATAGAGTACGAGTTGATAGGTGGGTGTGTAAG : 2349

```

11

```

      *      2720      *      2740      *
Fsp.MT1 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 2711
Fsp.MT4 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 2668
Asp.MT3 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 2622
Esp.MT2 : AGCTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 1819

```

```

      *      2760      *      2780      *
Fsp.MT1 : ATCCATCCTGGGGCTGAGAGTGGTCCCAAGGGTATGGCTGTT : 2754
Fsp.MT4 : ATCCATCCTGGGGCTGAGAGTGGTCCCAAGGGTATGGCTGTT : 2711
Asp.MT3 : ATCCATCCTGGGGCTGAGAGTGGTCCCAAGGGTATGGCTGTT : 2665
Esp.MT2 : ATCCATCCTGGGGCTGAGAGTGGTCCCAAGGGTATGGCTGTT : 1862

```

```

      *      2800      *      2820      *      28
Fsp.MT1 : CGCCATTAAAGTGGACGGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGA : 2797
Fsp.MT4 : CGCCATTAAAGTGGACGGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGA : 2754
Asp.MT3 : CGCCATTAAAGTGGACGGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGA : 2708
Esp.MT2 : CGCCATTAAAGTGGACGGAGCTGGGTTCAGAACGTCGTGA : 1905

```

```

      *      2840      *      2860      *      2880
Fsp.MT1 : GACAGTTGGTCCCTATCTGGGTGGAGCTTCAGATTTGAGA : 2840
Fsp.MT4 : GACAGTTGGTCCCTATCTGGGTGGAGCTTCAGATTTGAGA : 2797
Asp.MT3 : GACAGTTGGTCCCTATCTGGGTGGAGCTTCAGATTTGAGA : 2751
Esp.MT2 : GACAGTTGGTCCCTATCTGGGTGGAGCTTCAGATTTGAGA : 1948

```

```

      *      2900      *      2920
Fsp.MT1 : GGGGCTGCTCTAGTACGAGAGGACCGAGTGGACAACTCT : 2883
Fsp.MT4 : GGGGCTGCTCTAGTACGAGAGGACCGAGTGGACAACTCT : 2840
Asp.MT3 : GGGGCTGCTCTAGTACGAGAGGACCGAGTGGACAACTCT : 2794
Esp.MT2 : GGGGCTGCTCTAGTACGAGAGGACCGAGTGGACAACTCT : 1991

```

```

      *      2940      *      2960
Fsp.MT1 : GGTGTATCGTTTGTATCCCAAGTGCATTTAGGTAGCTAG : 2926
Fsp.MT4 : GGTGTATCGTTTGTATCCCAAGTGCATTTAGGTAGCTAG : 2883
Asp.MT3 : GGTGTATCGTTTGTATCCCAAGTGCATTTAGGTAGCTAG : 2837
Esp.MT2 : GGTGTATCGTTTGTATCCCAAGTGCATTTAGGTAGCTAG : 2034

```

```

      *      2980      *      3000      *
Fsp.MT1 : TTGGGAAGAGATAAAGCTGAAGGATTTAAGGGGAAACTAG : 2969
Fsp.MT4 : TTGGGAAGAGATAAAGCTGAAGGATTTAAGGGGAAACTAG : 2926
Asp.MT3 : TTGGGAAGAGATAAAGCTGAAGGATTTAAGGGGAAACTAG : 2880
Esp.MT2 : TTGGGAAGAGATAAAGCTGAAGGATTTAAGGGGAAACTAG : 2077

```

10

```

      *      3320      *      3340      *
Fsp.MT1 : AGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 3274
Fsp.MT4 : AGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 3222
Asp.MT3 : AGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 3217
Esp.MT2 : AGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 2377

```

```

      *      3360      *      3380      *      3
Fsp.MT1 : GAGCCTATAGAGTATGGAGGACCTGATCCCATCCGAACTG : 3316
Fsp.MT4 : GAGCCTATAGAGTATGGAGGACCTGATCCCATCCGAACTG : 3264
Asp.MT3 : GAGCCTATAGAGTATGGAGGACCTGATCCCATCCGAACTG : 3259
Esp.MT2 : TGAATATAGAGTATGGAGGACCTGATCCCATCCGAACTG : 2419

```

```

      *      3400      *      3420      *      3440
Fsp.MT1 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 3359
Fsp.MT4 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 3307
Asp.MT3 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 3299
Esp.MT2 : GAGTTCATATCGACGGGGGTGTTGGCACTCGATGTCGGCTG : 2456

```

```

      *      3460      *
Fsp.MT1 : ATGTGAGAGTAGGTGATCG----- : 3378
Fsp.MT4 : ATGTGAGAGTAGGTGATCG----- : 3328
Asp.MT3 : ----- : -
Esp.MT2 : ----- : -

```

12

---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis für die Ermöglichung dieser Dissertation in der Abteilung Umweltmikrobiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig, danken. Ich bedanke mich für die gewährte Unterstützung und für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr. Wolf-Rainer Abraham, in dessen Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie die Arbeit angefertigt wurde, möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung, die Diskussionen und die kritische Durchsicht der Arbeit bedanken.

Mein ganz herzlicher Dank gilt dem gesamten Labor D0.17 mit allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern: Dagmar Wenderoth, Tanja Jeschke und Peter Wolff für erste technische Hilfe sowie Ina Buchholz, Jenny Skerra und Miriam Harms, welche mit ihrer Fröhlichkeit und guten Zusammenarbeit eine ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. René Huppmann und Esther Surges sei für die vielen Diskussionen und analytischen Messungen an HPLC, GC, GC-MS, GC-C-IRMS und EA-IRMS, für ihre andauernde Hilfsbereitschaft sowie für die vielen aufmunternden Worte gedankt. Alexandre Macedo möchte ich für die kurzen aber hilfreichen Diskussionen im letzten ½ Jahr danken.

Vielen Dank auch an das Labor D0.08. Die SSCP-Fingerprint-Analytik wäre ohne das Know-how von Dirk Wenderoth und Agnes Waliczek nicht möglich gewesen. Für die engagierten Diskussionen über die Chemostaten und PCB-Biofilme möchte ich mich bei Massimo Strocchi und Robert Witzig bedanken. Ed Moore sei für die Hilfe beim Oligonukleotid-Design und Annette Krüger für die Sequenzierungs-Hilfe gedankt. Ganz besonders danke ich Daniela Regenhardt und Holger Heuer für ihre menschliche und fachliche Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Mikrobiellen Ökologie, insbesondere bei Ines Pöhler, Kerstin Wilken, Björg Pauling, Wanda Fehr, Filip Kaminski und Heinrich Lünsdorf, möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und ihr aufmunterndes Interesse bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Björn Henze für die Hilfe am BIACORE® und die Durchsicht des Manuskripts bedanken. Daniela Regenhardt, Jens Schumacher und Lotte Görres sei ebenso für mühevollen Korrekturen und Diskussionen gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die andauernde Aufmunterung und Unterstützung.

---

## LEBENS LAUF

Stefanie Tillmann

geb. Hermann                      am 27.02.1973 in Lübeck

### *Schul Ausbildung*

1983 - 1992                      Gymnasium Katharineum zu Lübeck

23.05.1992                      Abitur

Aug. 92 – Feb. 93              Auslandsaufenthalt als Au-pair in Florida, USA

### *Studium*

April 93 – Juni 95              Grundstudium Biologie an der Freien Universität in Berlin

20.06.1995                      Vorprüfung zur Diplomprüfung

Okt. 95 – Sept. 99              Hauptstudium Biologie an der Technischen Universität Braunschweig

Dez. 98 – Aug. 99              Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Wolf-Rainer Abraham,  
Chemische Mikrobiologie der GBF, Braunschweig, mit dem Thema:  
Untersuchung des Einbaus stabiler Isotope in unterschiedlichen  
Zellkomponenten einzelner Mitglieder bakterieller Konsortien mittels  
Isotopenmassenspektrometrie (IRMS).

24.09.1999                      Diplomprüfung Hauptfach Mikrobiologie,  
Nebenfächer Biochemie/Biotechnologie und Ökologie

März 1993                      Praktikum am polarökologischen Institut der Universität Kiel

Aug. - Sept. 1995              Praktikum im MPI für Limnoökologie in Plön

Aug. – Nov. 97 und              Studentische Mitarbeiterin im Institut für Mikrobiologie  
April – Juni 99                  der TU-Braunschweig.

Sept. 98 – Juli 99              Studentische Mitarbeiterin in der Abt. Mikrobiologie der GBF

Dez. 1999                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe  
Chemische Mikrobiologie der GBF, Braunschweig

Nov. 2003                      Einreichen der vorliegenden Dissertation